

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA BACARIN HERMANN

AÇÃO DE DESFEROXAMINA E DEFERASIROX EM ERITRÓCITOS DE
PORTADORES DE ANEMIAS DEPENDENTES DE TRANSFUSÃO, COM
SOBRECARGA OXIDATIVA, *IN VITRO*

CURITIBA

2011

PRISCILA BACARIN HERMANN

AÇÃO DE DESFEROXAMINA E DEFERASIROX EM ERITRÓCITOS DE
PORTADORES DE ANEMIAS DEPENDENTES DE TRANSFUSÃO, COM
SOBRECARGA OXIDATIVA, *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Suely Soares Leonart

Co-orientadores: Prof. Dr. Aguinaldo José do Nascimento
Prof. Dr. Eurípides Ferreira

CURITIBA

2011

Hermann, Priscila Bacarin

Ação de desferoxamina e deferasirox em eritrócitos de portadores de anemias dependentes de transfusão, com sobrecarga oxidativa, *in vitro*

/ Priscila Bacarin Hermann – Curitiba, 2011.

130 f.: il. (algumas color.); 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Maria Suely Soares Leonart

Coorientador: Professor Dr. Aguinaldo José do Nascimento

Coorientador: Professor Dr. Eurípides Ferreira

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2011.

Inclui bibliografia

1. Desferoxamina. 2. Deferasirox. 3. Eritrócito. 4. Metabolismo

oxidativo. I. Leonart, Maria Suely Soares. II. Nascimento, Aguinaldo José do. III. Ferreira, Eurípides. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 612.111

Para Jociel,
amigo, companheiro
e grande amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças e sempre atender às minhas orações.

A meus pais Maria Eunice Bacarin Hermann e Marcos Aurélio Hermann pelo incentivo constante.

A meu marido Jociel Bordignon, pelo apoio incondicional. Por nunca ter me deixado desistir, mesmo nos momentos mais difíceis. Por ter sido exemplo de dedicação e perseverança, ter me mostrado que nunca é tarde para realizar os sonhos e por todo o amor que me concede diariamente.

A minha orientadora, professora Maria Suely Soares Leonart, que me acolheu em seu laboratório e me deu a oportunidade de ampliar os horizontes, por sua amizade e todo o conhecimento repassado.

Ao meu co-orientador professor Aguinaldo José do Nascimento, o “rei” da estatística, por sua paciência, dedicação e prontidão em ajudar sempre.

Ao meu também co-orientador Dr. Eurípides Ferreira, a primeira pessoa a me incentivar nesse projeto, que apesar de sempre dizer “a Priscila não sabe nada”, sempre acreditou no meu trabalho.

Ao professor Railson Henneberg, o grande responsável pela finalização desse trabalho. Pela imensa e imprescindível ajuda, paciência e respeito.

A toda equipe do laboratório escola: minha colega de longa data Aline Emmer Ferreira Furman, pela companhia nos experimentos; professora Aline Borsato Hauser, pela simpatia e gentileza; e Marina Mazanek Lacerda, pelo bom humor de sempre e por nunca ter, de fato, me colocado de “molho no hipoclorito”.

A minha querida colega Zeni Vogler, por todas as conversas, sempre proveitosas e por todo o incentivo recebido.

A todos do programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade. Aos meus colegas da turma de 2010, meus companheiros do início torturante, especialmente Cássia Cunico, Keylla Lençone, Ana Carolina Pareja Lobo, Gisleine Fujiwara, Alberto Cardoso Martins Lima e Katia Boritza.

A Dra. Edna Kakitani Carboni, que me abriu as portas do HEMEPAR, pela simplicidade e delicadeza. A toda equipe do HEMEPAR, pela imensa ajuda com as

amostras, especialmente à bioquímica Cinthia Pelissari, pela colaboração e compreensão.

A todos os pacientes e voluntários que, literalmente, deram o sangue pela realização desse trabalho.

A Novartis, pela doação dos fármacos utilizados, especialmente à Dra. Sandra Loggetto pela gentileza e presteza.

A todos os meus colegas de trabalho, antigos ou atuais, que sempre me deram forças, Fabíola, João Paulo, Roberta, Sheila, Mariana, Patrícia, Luana, Kiara, Carla, Karen, Sílvia e todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram, Ana Clara, Yara, Isabela, Fabrício, Marina, Guilherme e Bruno “Madruga”.

A Alecassandra Vodiani, minha querida “Lelequinha”, companheira da longa jornada, por sua fiel amizade. A Gisleine Polistchuk Berendsen, que me deu a oportunidade de começar, mesmo sem nenhuma experiência, por todos os sorrisos, as lágrimas e os conselhos. E, especialmente, a Lucretius Berendsen, que me iniciou na arte da hematologia, por ter me ensinado não só o segredo dos linfócitos atípicos e pró-mielócitos, mas também por ser meu exemplo de excelência profissional.

"Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo, só depende de nossa vontade e perseverança."

Albert Einstein

RESUMO

Os eritrócitos são células altamente especializadas, continuamente expostas ao estresse oxidativo, devido à exposição a alta tensão de oxigênio e ao íon ferro, ambos capazes de iniciar a geração de radicais livres. Pacientes portadores de algumas doenças como talassemias e anemia falciforme, entre outras, podem apresentar sobrecarga de ferro transfusional e conseqüente aumento nos parâmetros de estresse oxidativo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação dos quelantes de ferro desferoxamina (DFO) e deferasirox (DFX) no metabolismo oxidativo de eritrócitos normais e de pacientes em tratamento com esses medicamentos. Foram obtidas amostras de 10 indivíduos considerados normais, 14 pacientes com β -talassemia maior em tratamento com DFO e 5 pacientes em tratamento com DFX, sendo 4 com β -talassemia maior e 1 com anemia falciforme. Foram avaliadas, ainda, amostras de 2 pacientes com β -talassemia intermédia e 10 pacientes com anemia falciforme, sem tratamento quelante. Os eritrócitos dos pacientes foram incubados com os agentes oxidantes tBHP e AAPH e os eritrócitos dos indivíduos normais foram incubados com soluções dos quelantes em estudo e, posteriormente, com os mesmos oxidantes. Foram realizadas determinações de concentrações de metemoglobina, glutathiona reduzida, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase e porcentagens de hemólise. A partir dos resultados obtidos demonstrou-se que os valores basais dos indivíduos normais e dos pacientes foram semelhantes. A incubação com os oxidantes alterou significativamente os parâmetros de estresse oxidativo em todos os grupos, sendo significativamente diferentes nos pacientes com anemias, comparados com os normais. Foram observados aumentos nas concentrações de metemoglobina, formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e porcentagens de hemólise, bem como diminuição nas concentrações de glutathiona reduzida e atividades enzimáticas da glicose 6-fosfato desidrogenase. Foi observada uma proteção parcial dos quelantes de ferro estudados, DFO e DFX, contra a oxidação, evidenciada principalmente pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e porcentagens de hemólise. Esses resultados confirmam a maior susceptibilidade aos processos oxidativos dos eritrócitos de pacientes portadores de sobrecarga de ferro transfusional, quando comparados aos eritrócitos de indivíduos normais.

Palavras-chave: Desferoxamina, Deferasirox, Eritrócito, Metabolismo oxidativo.

ABSTRACT

Red blood cells are highly specialized, being continuously exposed to oxidative stress, due to the presence of high-tension oxygen and iron ion, both able to start generating free radicals. Patients with certain diseases such as sickle cell anemia and thalassaemia, among others, can have transfusional iron overload and consequent increase in oxidative stress parameters. The present study aimed to evaluate the action of iron chelating agents as deferoxamine (DFO) and deferasirox (DFX) in the erythrocyte oxidative metabolism in normal individuals and patients in treatment with these medications. Samples were obtained of 10 individuals considered normal, in 14 β -thalassaemic major patients under DFO treatment plus 5 patients under DFX treatment, being 4 with β -thalassaemia major and 1 with sickle cell anemia. It were still evaluated, 2 samples of patients with β -thalassaemia intermedia and 10 patients with sickle-cell disease, without chelation treatment. Red cells of patients were incubated with oxidizing agents tBHP and AAPH. Red cells of normal individuals were incubated with solutions of chelating agents under study and, later, with the same oxidants. It were carried out determinations of methemoglobin concentration, reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive substances, activity of the enzyme glucose 6-phosphate dehydrogenase and percentages of hemolysis. There results obtained showed that the basal values of normal individuals and patients were similar. Incubation with oxidants significantly changed the parameters of oxidative stress in all groups, being significantly higher in anemic patients than in normal individuals. There were observed increased concentrations of methemoglobin, formation of thiobarbituric acid reactive substances and percentages of hemolysis as well as decrease in concentrations of reduced glutathione and enzymatic activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase. There was observed partial protection against oxidation iron chelating agents, evidenced mainly on thiobarbituric acid reactive substances parameters and percentages of hemolysis. The results obtained confirmed the higher susceptibility of the erythrocyte from patients with transfusional iron overload to oxidation processes, compared thus with erythrocytes from normal individuals.

Key words: Deferoxamine, Deferasirox, Erythrocyte. Oxidative metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	ERITRÓCITO HUMANO MADURO NORMAL.....	21
FIGURA 2	MOLÉCULA DA HEMOGLOBINA.....	22
FIGURA 3	ATIVIDADE DE FERRO NOS TECIDOS HUMANOS	23
FIGURA 4	VIAS GLICOLÍTICA E DAS PENTOSE FOSFATO NO ERITRÓCITO.....	26
FIGURA 5	ESQUEMA GERAL DA VIA DAS PENTOSE FOSFATO	27
FIGURA 6	SÍNTESE DO 2,3-BIFOSFOGLICERATO PELO CICLO DE LUEBERING- RAPOPORT.....	28
FIGURA 7	DEFESA ANTIOXIDANTE DA G6-PD NOS ERITRÓCITOS.....	32
FIGURA 8	GLUTATIONA (GSH).....	33
FIGURA 9	ETAPAS NA REDUÇÃO UNIVALENTE DO OXIGÊNIO E VIAS ENZIMÁTICAS QUE AFETAM OS INTERMEDIÁRIOS.....	34
FIGURA 10	TERC-BUTILHIDROPERÓXIDO (tBHP).....	35
FIGURA 11	DICLORIDRATO DE 2,2'-AZOBIS-(2-METILPROPANOAMIDINA)(AAPH)	36
FIGURA 12	MECANISMO DE LESÃO E PROTEÇÃO ERITROCITÁRIAS NA SOBERCARGA DE FERRO	39
FIGURA 13	ERITRÓCITOS DE PACIENTE COM ANEMIA FALCIFORME EXAMINADOS AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA.....	45
FIGURA 14	MOLÉCULA DA DESFEROXAMINA	50
FIGURA 15	MOLÉCULA DA DEFERIPRONA	53
FIGURA 16	MOLÉCULA DO DEFERASIROX.....	55
FIGURA 17	REAÇÃO PARA DETECÇÃO DA GLUTATIONA.....	69
FIGURA 18	REAÇÃO UTILIZADA PARA DETECÇÃO DE MDA EM PLASMA HUMANO ...	71
FIGURA 19	FREQUENCIAS DE SEXO E IDADE PARA OS GRUPOS CONTROLE E PACIENTES TRATADOS COM DFO/L1 E DFX	76
FIGURA 20	VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA PARA O GRUPO CONTROLE E DE PACIENTES TRATADOS COM DFO/L1 E DFX	77
FIGURA 21	FORMAÇÃO DE METEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP.....	78
FIGURA 22	FORMAÇÃO DE METEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFO E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 5 mmoles/l DE tBHP.....	78
FIGURA 23	FORMAÇÃO DE METEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 5 mmoles/l DE tBHP	79

FIGURA 24	FORMAÇÃO DE METEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP.....	80
FIGURA 25	COMPARAÇÃO DOS VALORES DE METEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE 1 mmol/l DE tBHP.....	80
FIGURA 26	FORMAÇÃO DE METEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS E DE PORTADORES DE TALASSEMIA INTERMÉDIA OU ANEMIA FALCIFORME, SEM TRATAMENTO QUELANTE, SUBMETIDOS À AÇÃO DE tBHP.....	81
FIGURA 27	CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP.....	82
FIGURA 28	CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFO E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 5 mmoles/l DE tBHP.....	82
FIGURA 29	CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 5 mmoles/l DE tBHP	83
FIGURA 30	CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP.....	83
FIGURA 31	COMPARAÇÃO DOS VALORES DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO/L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP	84
FIGURA 32	CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS E DE PACIENTES PORTADORES DE TALASSEMIA INTERMÉDIA OU ANEMIA FALCIFORME, SEM TRATAMENTO QUELANTE, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP	84
FIGURA 33	FORMAÇÃO DE TBARS EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP.....	85
FIGURA 34	CONCENTRAÇÃO DE TBARS EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFO E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 3 mmoles/l DE tBHP.....	85
FIGURA 35	CONCENTRAÇÃO DE TBARS EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 3 mmoles/l DE tBHP	86
FIGURA 36	CONCENTRAÇÃO DE TBARS EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP.....	86
FIGURA 37	COMPARAÇÃO DOS VALORES DE TBARS EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP.....	87

FIGURA 38	CONCENTRAÇÃO DE TBARS EM ERITRÓCITOS NORMAIS E DE PORTADORES DE TALASSEMIA INTERMÉDIA E ANEMIA FALCIFORME, SEM TRATAMENTO QUELANTE, SUBMETIDOS À AÇÃO DE tBHP	87
FIGURA 39	ATIVIDADE DA ENZIMA G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE tBHP	88
FIGURA 40	ATIVIDADE DA ENZIMA G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFO E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 5 mmoles/l DE tBHP.....	88
FIGURA 41	ATIVIDADE DA ENZIMA G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 5 mmoles/l DE tBHP	89
FIGURA 42	CONCENTRAÇÃO DE G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP	89
FIGURA 43	COMPARAÇÃO DOS VALORES DE G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP	90
FIGURA 44	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS E DE PACIENTES PORTADORES DE TALASSEMIA INTERMÉDIA E ANEMIA FALCIFORME, SEM TRATAMENTO QUELANTE, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP	90
FIGURA 45	PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE AAPH.....	91
FIGURA 46	PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFO E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 100 mmoles/l DE AAPH	91
FIGURA 47	PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 100 mmoles/l DE AAPH	92
FIGURA 48	PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE AAPH	93
FIGURA 49	COMPARAÇÃO DOS VALORES DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE AAPH	93
FIGURA 50	PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS E DE PACIENTES PORTADORES DE TALASSEMIA INTERMÉDIA E ANEMIA FALCIFORME SEM TRATAMENTO QUELANTE, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE AAPH	94

LISTA DE SIGLAS

2,3-BPG	- 2,3-bifosfoglicerato
AAPH	- Dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina)
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	- Adenosina trifosfato
BRATS	- Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde
CAT	- Catalase
DFO	- Desferoxamina
DFX	- Deferasirox
DTNB	- Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)
EM	- Embden-Meyerhof
FDA	- Food and Drug Administration
G6-P	- Glicose 6-fosfato
G6-PD	- Glicose 6-fosfato desidrogenase
GPx	- Glutathione peroxidase
GSH	- Glutathione reduzida
GSSG	- Glutathione oxidada
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
Hb	- Hemoglobina
HO [•]	- Radical hidroxila
INPI	- Instituto Nacional de Propriedade Industrial
L1	- Deferiprona
LDH	- Lactato desidrogenase
NAD	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	- NAD na forma reduzida
NADP ⁺	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma oxidada
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PBS	- Tampão fosfato salina
PGK	- Fosfoglicerato quinase

SMD	- Síndromes mielodisplásicas
SOD	- Superóxido dismutase
SUS	- Sistema Único de Saúde
tBHP	- <i>terc</i> -butilhidroperóxido
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	ERITRÓCITO.....	21
2.2	HEMOGLOBINA	22
2.3	METABOLISMO DO FERRO.....	23
2.4	METABOLISMO DO ERITRÓCITO.....	25
2.4.1	Estresse Oxidativo.....	28
2.4.2	Metabolismo Antioxidante do Eritrócito.....	31
2.5	AGENTES OXIDANTES.....	35
2.5.1	<i>Terc</i> -Butilhidroperóxido (<i>t</i> BHP).....	35
2.5.2	Dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (AAPH)	36
2.6	SOBRECARGA DE FERRO	38
2.7	ANEMIAS DEPENDENTES DE TRANSFUSÃO, PREDISPOSTAS À SOBRECARGA DE FERRO	40
2.7.1	Talassemias	41
2.7.2	Anemia Falciforme	44
2.7.3	Outras Anemias Dependentes de Transfusão... ..	47
2.8	TERAPIA QUELANTE DE FERRO	48
2.8.1	Desferoxamina.....	50
2.8.2	Deferiprona	52
2.8.3	Deferasirox	55
3	OBJETIVOS	61
3.1	OBJETIVO GERAL.....	61
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.1	MATERIAL.....	63

4.1.1	Reagentes	63
4.1.2	Amostras de Sangue	63
4.2	MÉTODOS.....	64
4.2.1	Coleta do Material	64
4.2.2	Isolamento dos Eritrócitos.....	65
4.2.3	Tratamento das Amostras do Grupo Controle com os Quelantes de Ferro.....	65
4.2.4	Tratamento das Amostras com Substâncias Oxidantes.....	66
4.2.4.1	Incubação dos eritrócitos com tBHP	66
4.2.4.2	Incubação dos eritrócitos com AAPH	67
4.2.5	Determinação da Concentração de Metemoglobina	67
4.2.5.1	Cálculo da concentração de metemoglobina	67
4.2.5.2	Princípio da técnica.....	68
4.2.6	Dosagem da Concentração de Glutathione Reduzida (GSH).....	68
4.2.6.1	Cálculo da concentração de GSH	69
4.2.6.2	Princípio da técnica.....	69
4.2.7	Dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	70
4.2.7.1	Cálculo da Concentração das TBARS	70
4.2.7.2	Princípio da técnica.....	70
4.2.8	Determinação da Atividade Enzimática da Glicose 6-fosfato Desidrogenase (G6-PD)	71
4.2.8.1	Cálculo da Atividade Enzimática da G6-PD.....	72
4.2.8.2	Princípio da técnica.....	72
4.2.9	Determinação das Porcentagens de Hemólise	73
4.2.9.1	Cálculo das porcentagens de hemólise	73
4.2.9.2	Princípio da técnica.....	73
4.2.10	Análise Estatística dos Resultados.....	74
5	RESULTADOS.....	76
5.1	DOSAGEM DE METEMOGLOBINA	78
5.2	DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE GSH	82

5.3	DOSAGEM DE CONCENTRAÇÃO DAS TBARS	85
5.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA G6-PD	88
5.5	DOSAGEM DAS PORCENTAGENS DE HEMÓLISE	91
6	DISCUSSÃO	96
6.1	CONCENTRAÇÃO DE METEMOGLOBINA	97
6.2	CONCENTRAÇÃO DE GSH	99
6.3	CONCENTRAÇÃO DAS TBARS	102
6.4	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA G6-PD	103
6.5	HEMÓLISE	105
6.6	ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS	107
7	CONCLUSÕES	110
	REFERÊNCIAS	113
	ANEXOS	126

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os eritrócitos constituem as células mais numerosas do sangue, necessárias à respiração dos tecidos. O eritrócito humano maduro consiste em uma célula discóide bicôncava, anucleada, porém altamente especializada, que contém hemoglobina, proteína que carrega ferro e atua no transporte de oxigênio e dióxido de carbono (PERKINS, 2004; TELEN & KAUFMAN, 2004). Os eritrócitos são células frágeis, altamente suscetíveis a danos causados pelos radicais livres na membrana celular. O seu estresse oxidativo e a proteção exercida por compostos antioxidantes servem como um bom modelo para demonstrar o comportamento de propriedades pró-oxidantes e antioxidantes (BANERJEE *et al.*, 2008).

Pacientes portadores de alguns tipos de anemia necessitam de frequentes transfusões sanguíneas para manter seus níveis de hemoglobina dentro de valores aceitáveis. Essas transfusões, em longo prazo, efetivamente previnem as complicações de doenças como anemia falciforme, talassemias, síndromes mielodisplásicas, anemia aplástica, entre outras (BRITTENHAM, 2011).

Como os seres humanos não possuem qualquer meio eficaz de excretar o excesso de ferro, um regime de transfusões frequentes, em longo prazo, produz sobrecarga de ferro. A eritropoiese ineficaz e a medula óssea hiperativa favorecem aumento da absorção de ferro e contribuem para a sobrecarga imposta pelas transfusões. Altos níveis de ferro livre são prejudiciais pois, através da reação de Fenton, geram espécies reativas de oxigênio, que podem levar à oxidação exacerbada de lipídeos e proteínas, com conseqüente dano à membrana do eritrócito, principalmente quando estes são expostos a estresse oxidativo (COMPORTI *et al.*, 2002; BORGNA-PIGNATTI *et al.* 2006; BRITTENHAM, 2011)

O ferro livre, em excesso, se deposita em órgãos vitais como fígado e coração, levando ao agravamento da morbidade e à diminuição da sobrevida dos pacientes. Desta forma, a terapia a base de quelantes de ferro deve ser considerada em todos os pacientes que necessitam de transfusão sanguínea em longo prazo (KUSHNER *et al.*, 2001; BORGNA-PIGNATTI *et al.*, 2006; CANÇADO, 2007).

O mesilato de desferoxamina (DFO) foi o primeiro medicamento utilizado como quelante de ferro, no início da década de 1970, sendo durante anos o padrão

de tratamento. Há evidências na literatura sobre os seus benefícios, diminuindo a morbidade e mortalidade dos pacientes. Infelizmente, devido aos desafios da administração parenteral da DFO, a conformidade com a terapia prescrita é muitas vezes deficiente, resultando em limitada eficácia (CAPPELLINI *et al.*, 2006).

Desta forma, surgiu a necessidade do desenvolvimento de novas terapias quelantes de ferro, priorizando a administração oral. O primeiro fármaco utilizado foi a deferiprona (L1), um quelante oral efetivo, porém com restrições quanto a sua aprovação e indicação, devido a eventos adversos (KUSHNER *et al.*, 2001; CANÇADO, 2007).

Recentemente, foi introduzido na prática clínica o deferasirox (DFX), um novo quelante de ferro tridentado, que pode ser administrado por via oral em uma única dose diária. O DFX foi aprovado no final de 2005 e vem sendo considerado um marco na história do tratamento da sobrecarga de ferro, pois possibilita maior adesão ao tratamento, melhor controle do ferro do organismo e enormes chances de melhorar a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes (CANÇADO, 2007; WALTER *et al.*, 2008).

Santos *et al.* (2009) desenvolveram um estudo sobre os efeitos, *in vitro*, de DFO e ou L1 no metabolismo oxidativo de eritrócitos normais e de pacientes com β -talassemia, sob a ação pró-oxidativa de *tert*-butilhidroperóxido (tBHP), observando oxidação exacerbada nos eritrócitos dos β -talassêmicos, bem como uma proteção parcial contra a oxidação por ambos os fármacos.

Desta forma, observa-se a importância de se realizar estudos específicos sobre uma possível ação protetora do DFX no metabolismo oxidativo dos eritrócitos. Sendo assim, o presente trabalho visa avaliar os efeitos, *in vitro*, da DFO e do DFX no metabolismo oxidativo de eritrócitos normais e de pacientes portadores de anemias dependentes de transfusão, sob estresse oxidativo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ERITRÓCITO

O eritrócito humano maduro (Figura 1) apresenta-se na forma de disco achatado bilateralmente, referida como disco bicôncavo ou discócito. Estas células são anucleadas, porém altamente especializadas e, na falta de organelas citoplasmáticas, são incapazes de sintetizar novas proteínas, que realizam as reações oxidativas associadas a eventos bioquímicos, antigênicos e morfológicos (HEYEN, 1990; PERKINS, 2004).

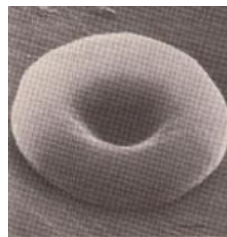


FIGURA 1 – ERITRÓCITO HUMANO MADURO NORMAL
FONTE: TELEN & KAUFMAN (2004)

Os eritrócitos são formados a partir de células-tronco precursoras chamadas hemocitoblastos. No processo normal de maturação, a célula-tronco produz células-filhas que formam grandes quantidades de hemoglobina e depois perdem suas organelas internas. Portanto, os eritrócitos são células vestigiais incompletas, incapazes de se reproduzir e, nos humanos, destinados a sobreviver por cerca de 120 dias (NELSON, 2006).

Os eritrócitos expressam um número surpreendente de proteínas, mas a principal é a hemoglobina, constituída de ferro, que atua no transporte de oxigênio e dióxido de carbono e representa mais de 95% da proteína citoplasmática. Além disso, o eritrócito possui enzimas necessárias para a produção de energia e a manutenção da hemoglobina no estado reduzido e funcional (PERKINS, 2004; TELEN & KAUFMAN, 2004).

A relação entre superfície e volume do eritrócito aproxima-se do máximo valor possível, facilitando a transferência de gás e a maleabilidade que a célula necessita

na micro-circulação. Em circunstâncias fisiológicas normais o eritrócito possui a habilidade de manter a integridade da membrana, enquanto exibe extrema deformabilidade (TELEN & KAUFMAN, 2004).

2.2 HEMOGLOBINA

A hemoglobina humana (Figura 2) é uma das heme proteínas mais generalizada e especializada existente na natureza, cujo peso molecular é de aproximadamente 64,5 daltons (TELEN & KAUFMAN, 2004; WILD & BAIN, 2006).

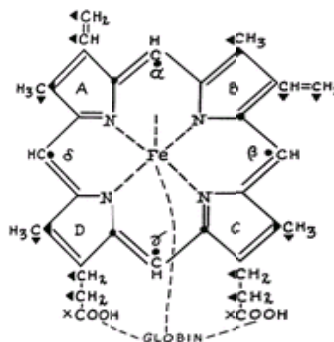


FIGURA 2 – MOLÉCULA DA HEMOGLOBINA
FONTE: TELEN & KAUFMAN (2004)

A molécula de hemoglobina é aproximadamente esférica, com um diâmetro de quase 5,5 nm. Consiste em uma proteína tetramérica composta de dois pares de cadeias polipeptídicas similares chamadas globinas, que exibem um eixo de simetria. Cada uma das quatro cadeias acompanha um grupo prostético heme e um complexo de ferro (TELEN & KAUFMAN, 2004; NELSON, 2006).

Há sete tipos normais de hemoglobinas (Hb). Destas, quatro são embrionárias transitórias, denominadas Hb Gower 1 e 2 ($\xi_2\varepsilon_2$ e $\alpha_2\varepsilon_2$, respectivamente) e Portland 1 e 2 ($\zeta_2\gamma_2$); a Hb F ($\alpha_2\gamma_2$), ocorre predominantemente na vida fetal e constitui a maior proporção ao nascimento; a Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) é encontrada em pequenas quantidades em adultos; e a Hb A, majoritária em adultos e crianças, contém duas cadeias α , cada uma com 141 resíduos de aminoácidos e duas cadeias β , cada uma com 146 resíduos (WILD & BAIN, 2006).

Há mais de 750 variantes da hemoglobina humana, determinadas geneticamente. As síndromes resultantes de distúrbios na síntese da hemoglobina podem ocorrer por variantes estruturais da molécula, falha na síntese de uma ou mais cadeias globínicas ou falha na conversão da HbF a HbA. As alterações na estrutura da hemoglobina decorrem de mutações pontuais em uma ou mais bases que codificam os aminoácidos das cadeias globínicas. Essas variantes podem afetar as propriedades físicas ou químicas da molécula, resultando em alterações na solubilidade, estabilidade ou afinidade pelo oxigênio (WILD & BAIN, 2006).

2.3 METABOLISMO DO FERRO

Todos os organismos vivos necessitam de ferro para seu crescimento e para realizar trajetórias metabólicas cruciais à sua existência, estando presente no organismo humano em todas as células, exercendo várias funções vitais (Figura 3) (BENITE & MACHADO, 2002).

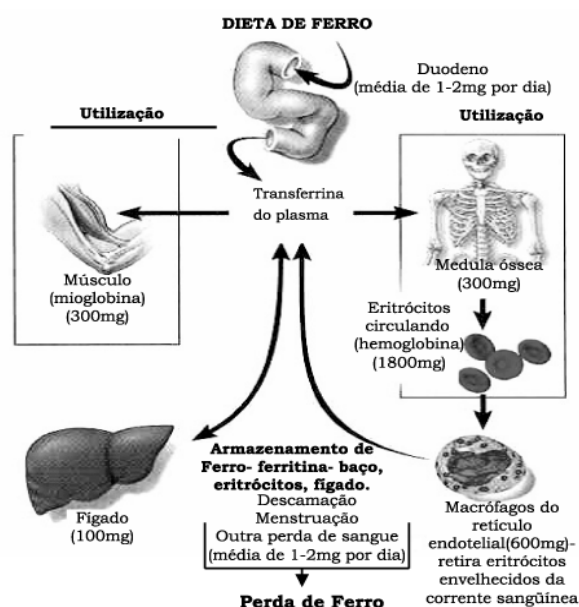


FIGURA 3 – ATIVIDADE DE FERRO NOS TECIDOS HUMANOS
FONTE: BENITE & MACHADO (2002)

O ferro é um elemento essencial, sendo o íon central do heme (GAW *et al.*, 1999). Possui a capacidade de aceitar e doar elétrons prontamente,

interconvertendo-se em forma férrica (Fe^{3+}) e ferrosa (Fe^{2+}). Esta propriedade o torna um componente muito útil em citocromos, moléculas que ligam e transportam oxigênio e enzimas que realizam o processo redox. Entretanto, é altamente reativo e danoso ao organismo quando se encontra livre, podendo causar danos aos tecidos se atuar como catalisador na conversão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em radicais livres e na propagação de eventos oxidativos que atacam a membrana celular, proteínas e DNA (RICE-EVANS, 1990; ANDREWS, 1999; BENITE & MACHADO, 2002; BENDOVA *et al.*, 2010).

O ferro ocupa uma cavidade central no anel porfirínico da molécula de hemoglobina, onde ligações covalentes o conectam aos quatro átomos de nitrogênio do pirrol. Na desoxihemoglobina o átomo de ferro fica fora do plano do heme e a ligação do oxigênio ao ferro envolve uma mudança no átomo, de alto spin para o de baixo spin, tornando-o menor e permitindo a sua entrada nesse plano. Essa ligação inicia a sequência de reações, que resulta nas mudanças conformacionais da molécula de hemoglobina, sob oxigenação. Uma falha em manter uma atmosfera hidrofóbica dentro do bolso do heme afeta a estabilidade da molécula inteira (GRIMES, 1980).

A absorção do ferro no eritrócito é dependente de endocitose mediada por receptor, e cada eritrócito contém cerca de um bilhão de átomos de ferro. O metal se acumula mais rapidamente no último estágio de maturação da célula, paralelamente à necessidade de síntese do heme (FORSBECK, 1990; HEYNEN, 1990; ANDREWS, 1999).

Mais de dois terços do conteúdo de ferro do organismo está incorporado no compartimento intra-eritrocitário. O remanescente pode ser armazenado nos hepatócitos e macrófagos ou distribuído dentro de proteínas, seguramente compartimentado para não participar da inicialização das reações mediadas por radicais livres (RICE-EVANS, 1990; ANDREWS, 1999; GAW *et al.*, 1999).

A principal proteína de transporte do ferro no plasma é a transferrina e a ferritina é a proteína universal de armazenamento intracelular (FORSBECK, 1990; RICE-EVANS, 1990; ANDREWS, 1999; WORWOOD, 2006; CANÇADO, 2007). Em circunstâncias normais, apenas vestígios de ferro existem fora desses drenos fisiológicos e o equilíbrio deste metal é tênue, pois tanto a deficiência como a sobrecarga de ferro são deletérias (RICE-EVANS, 1990; ANDREWS, 1999).

Eritrócitos senescentes são captados por macrófagos reticuloendoteliais que catabolizam a hemoglobina para eliminar o ferro, carregado para a transferrina para ser reutilizado (ANDREWS, 1999). Em adultos normais, a quantidade total de ferro é de aproximadamente 3 a 4 g e, diariamente, cerca de 20 a 30 mg são reciclados pelos macrófagos e liberados no fígado, baço e medula óssea, sendo reutilizados na produção de novos eritrócitos (KUSHNER *et al.*, 2001; WORWOOD, 2006; CANÇADO, 2007).

2.4 METABOLISMO DO ERITRÓCITO

O metabolismo produtor de energia no eritrócito depende de um suprimento constante de glicose, proveniente do plasma sanguíneo. A glicose entra no eritrócito por difusão facilitada através de um transportador específico (NELSON, 2006).

Sem mitocôndria, os eritrócitos maduros dependem de dois caminhos eficientes para a produção de compostos de alta energia, a via anaeróbica glicolítica ou via de Embden-Meyerhof (EM) e a via das pentoses fosfato (Figura 4). Em circunstâncias normais, cerca de 90% da glicose que entra no eritrócito é metabolizada pela via glicolítica e 10% pela via das pentoses. Sob condições de estresse oxidativo, no entanto, esta situação pode ser inversa (TELEN & KAUFMAN, 2004).

Na maioria dos tecidos animais, o principal destino catabólico da glicose 6-fosfato (G6-P) é a degradação glicolítica até piruvato, cuja maior parte é oxidada através do ciclo do ácido cítrico, tendo como objetivo final a produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). Existem, entretanto, outras vias catabólicas que podem mudar o destino da G6-P, gerando produtos especializados necessários para a célula, entre elas a oxidação em pentoses fosfato (Figura 5). Nesta via oxidativa, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP^+) é o receptor de elétrons e transforma-se em NADPH, empregado nas reduções biossintéticas ou na defesa contra os efeitos deletérios dos radicais livres gerados pelo oxigênio. Os eritrócitos podem prevenir ou recuperar o dano oxidativo das proteínas, lipídeos e outras moléculas sensíveis, mantendo um ambiente redutor, com alta relação entre NADPH e NADP^+ e entre as formas reduzida e oxidada da glutatona (NELSON, 2006).

Via Embden - Meyerhof
(Via anaeróbica do metabolismo da glicose)

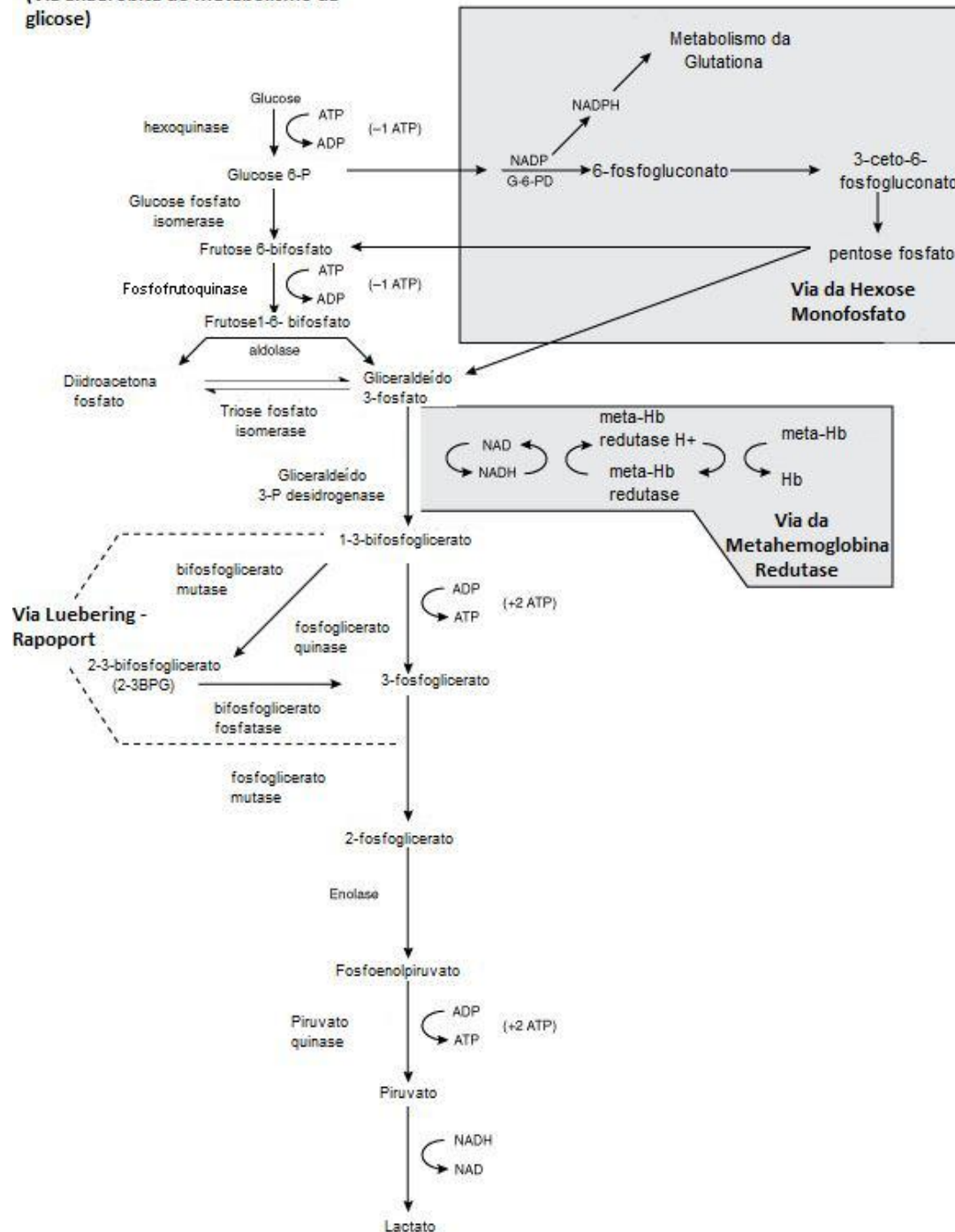


FIGURA 4 – VIAS GLICOLÍTICA E DAS PENTOSE FOSFATO NO ERITRÓCITO
FONTE: CALVO (2010)

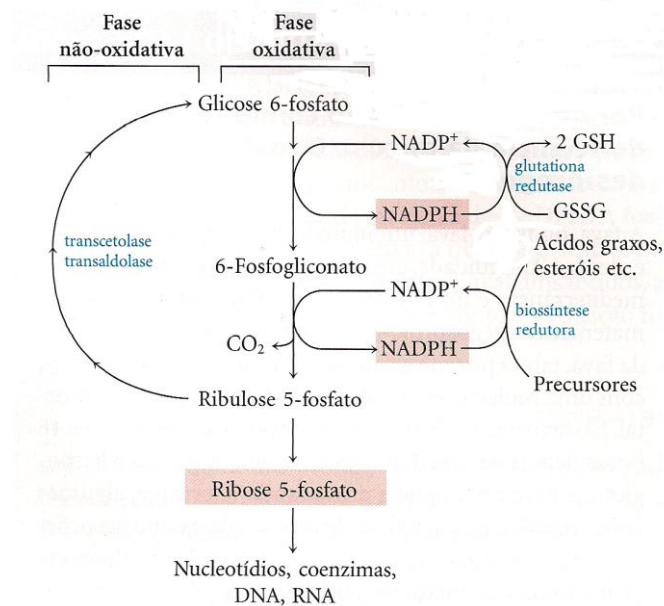


FIGURA 5 - ESQUEMA GERAL DA VIA DAS PENTOSSES FOSFATO
FONTE: NELSON (2006)

A via de EM é a principal rota de consumo da glicose nos eritrócitos e, nesta célula, difere qualitativamente da via em outras células pela presença de enzimas para a produção e hidrólise do 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG), composto presente em altas concentrações e envolvido no transporte de oxigênio. O 2,3-BPG é produzido, juntamente com o 3-fosfoglicerato, de um substrato comum, o 1,3-bifosfoglicerato, que sofre conversão a 3-fosfoglicerato e atua como um desvio para o passo da fosfoglicerato quinase (PGK). Esta seção da via de EM é o desvio de Luebering-Rapopport e a regulação entre os dois ramos é complexa. As duas vias competem pelo seu substrato e formam ATP ou 2,3-BPG, ambos inibidores de sua própria síntese, podendo o desvio ser um sistema auto-regulador designado para manter os níveis de ATP e 2,3-BPG, um em detrimento do outro (Figura 6) (GRIMES, 1980).

A ligação do oxigênio à hemoglobina é modulada pelo 2,3-BPG, que se liga em um sítio distinto e distante do sítio de ligação do oxigênio e regula a afinidade desta ligação. Em uma relação inversa, o 2,3-BPG reduz grandemente a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (NELSON, 2006).

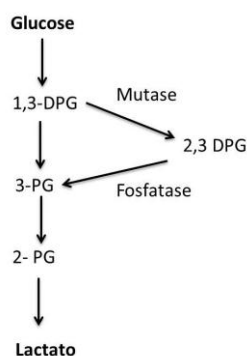


FIGURA 6 – SÍNTESE DO 2,3-BIFOSFOGLICERATO PELO CICLO DE LUEBERING-RAPOPORT
 FONTE: NAOUM (2011)

As enzimas da via de EM estão associadas com a membrana do eritrócito, onde mantêm os níveis dos intermediários glicolíticos, através do fluxo de glicose. Três destes intermediários são particularmente importantes nos eritrócitos, o 2,3-BPG, o ATP e a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), coenzima presente na célula em baixas concentrações, na forma oxidada (NAD^+) e reduzida (NADH) (GRIMES, 1980). Para cada molécula de glicose que entra na via, duas moléculas de NADH são geradas. Os rendimentos de ATP e 2,3-BPG variam, dependendo da atividade do desvio de Luebering-Rapoport. (TELEN & KAUFMAN, 2004).

2.4.1 Estresse Oxidativo

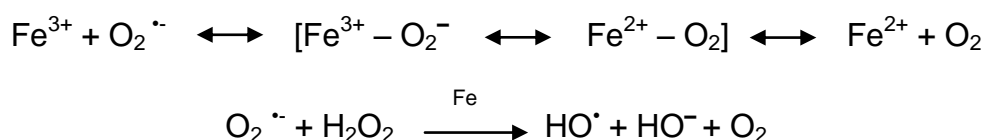
De acordo com a definição clássica, estresse oxidativo significa o distúrbio do balanço pró-oxidante/antioxidante em favor da oxidação, podendo causar dano potencial (DOMANSKI *et al.*, 2005; BENDOVA *et al.*, 2010). O eritrócito é considerado um modelo conveniente para estudos dos mecanismos de danos oxidativos, pois se trata de uma célula altamente especializada, sem aparatos para síntese de proteínas e sem a capacidade de reparar danos. Esta célula circula nos vasos sanguíneos com alta concentração de oxigênio e de íons ferro, estando constantemente expostos a radicais livres durante toda a sua vida na circulação, além de transportar e redistribuir antioxidantes e compostos modificados por ação dos radicais livres (DOMANSKI *et al.*, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Além disso, a hemoglobina está suscetível a sofrer auto-oxidação, que pode ser exacerbada por condições como aumento da temperatura, diminuição do pH,

presença de fosfatos orgânicos ou íons metálicos e sua própria oxigenação parcial (RICE-EVANS, 1990; TELEN & KAUFMAN, 2004; LÓPEZ-REVUELTA *et al.*, 2006).

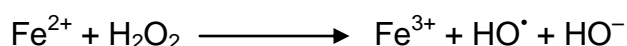
A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e a produção de radicais livres e outras espécies reativas é parte integrante do metabolismo humano, sendo observada em diversas condições fisiológicas. No entanto, quando sua produção é exacerbada, há efeitos prejudiciais como a peroxidação dos lipídios de membrana e a agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os danos oxidativos devidos à peroxidação lipídica de biomembranas têm sido implicados na patogênese de várias doenças. Espécies reativas de oxigênio, como por exemplo os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (HO^{\cdot}) e o oxigênio singlete (1O_2) são, geralmente, agentes de peroxidação, *in vivo*, constantemente gerados no organismo devido ao metabolismo normal (CHAUDHURI *et al.*, 2007).

O $O_2^{\cdot-}$ participa de processos químicos importantes no contexto biológico, como a produção do HO^{\cdot} através da redução de quelatos de Fe^{+3} , formando Fe^{+2} . Assim, o aumento do ferro na forma livre pode inicializar danos por radicais livres mediados pela formação de radicais HO^{\cdot} através da reação de Haber-Weiss (RICE-EVANS, 1990; BARREIROS *et al.*, 2006).



O HO^{\cdot} é o radical mais deletério ao organismo, pois possui meia-vida curta, dificilmente podendo ser seqüestrado *in vivo*. Este radical causa danos ao DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares e pode ser formado no organismo principalmente por reação do H_2O_2 com metais de transição ou homólise da água, por exposição a radiações ionizantes. No organismo, o Fe^{2+} é o metal mais envolvido nessas reações devido a sua maior biodisponibilidade, reagindo com o H_2O_2 através da reação de Fenton (BARREIROS *et al.*, 2006).



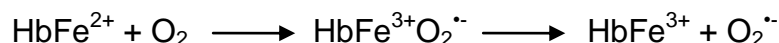
Radicais superóxido podem ser eficientemente convertidos a H_2O_2 pela superóxido dismutase (SOD), na presença de prótons:



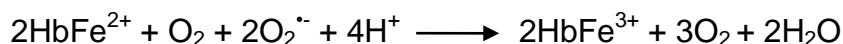
A oxidação da hemoglobina ocorre gradualmente, da forma totalmente reduzida para a totalmente oxidada. Na forma de desoxihemoglobina, o ferro encontra-se no estado em que seis elétrons estão na camada mais externa, quatro dos quais desemparelhados. Quando o oxigênio é adicionado, um destes elétrons é parcialmente transferido para ele (TELEN & KAUFMAN, 2004). Normalmente, quando o oxigênio é abandonado, a oxihemoglobina dissocia-se em hemoglobina parcialmente desoxigenada e oxigênio molecular:



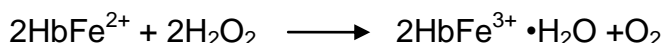
Em vez de oxigênio molecular, um $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode se dissociar, oxidando o ferro para o estado férrico, e produzindo metemoglobina:



A formação de metemoglobina também pode ocorrer, *in vivo*, como resultado da exposição ao superóxido:



E também de uma reação direta da diminuição da hemoglobina com o produto de redução do íon superóxido, peróxido:



Como resultado desses processos, a metemoglobina é formada em células normais a uma taxa de aproximadamente 0,5 a 3,0% por dia, mas é incapaz de ligar-se ao oxigênio porque, para que isso ocorra, o ferro na molécula de heme deve ser

mantido no estado reduzido ferroso (Fe^{2+}), apesar da exposição a uma variedade de agentes oxidantes endógenos e exógenos (TELEN & KAUFMAN, 2004).

Assim, a metemoglobina, cujo heme está ligado ao Fe^{3+} , não se combina com o oxigênio e não possui nenhuma função fisiológica, não sendo um pigmento respiratório. Possui coloração marrom com uma absorção máxima em 630 nm, uma propriedade usada como base para sua determinação (GRIMES, 1980).

Conforme a desnaturação oxidativa continua, a metemoglobina é convertida em derivados conhecidos como hemicromos, compostos férricos nos quais a sexta posição de coordenação torna-se covalentemente ligada a um ligante dentro da molécula da globina. Este complexo é chamado de "hemicromo reversível" porque pode ser convertido a desoxihemoglobina se for tratado com agentes redutores e diálise, em condições anaeróbicas. No entanto, o complexo não pode ser reversível *in vivo* porque não é passível de redução pela metemoglobina redutase. Em contraste, os "hemicromos irreversíveis" não podem ser convertidos de volta à hemoglobina normal, tanto *in vivo* como *in vitro*, ocorrendo distorções mais graves na estrutura terciária. Os produtos finais dessas mudanças são precipitados de hemicromos e de globina livre de heme que podem ligar-se à membrana celular e encurtar a sobrevida dos eritrócitos (TELEN & KAUFMAN, 2004).

Os danos sofridos pelos eritrócitos decorridos do estresse oxidativo geralmente são resultado final de dois processos: oxidação da hemoglobina, seguida de conversão da metemoglobina a hemicromos; e ataque dos radicais livres aos componentes lipídicos da membrana. Uma das principais consequências funcionais de tal dano é a quebra da barreira da membrana, acompanhada por uma dissipação de gradientes de íons, edema e lise celular (LÓPEZ-REVUELTA *et al.*, 2006).

2.4.2 Metabolismo Antioxidante do Eritrócito

Os eritrócitos mantêm uma variedade de vias metabólicas para impedir a ação dos agentes oxidantes e reduzir o ferro da hemoglobina, caso ela se torne oxidada. Alguns mecanismos conhecidos incluem a ação de metemoglobina redutase, superóxido dismutase (SOD), glutational peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (TELEN & KAUFMAN, 2004).

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6-PD) catalisa o primeiro passo da via das pentoses fosfato, convertendo G6-P em 6-fosfogluconolactona, produzindo NADPH durante esta conversão. O NADPH é necessário para a geração de glutathiona reduzida (GSH) a partir de sua forma oxidada (GSSG) e posterior manutenção dos estoques intracelulares de GSH, que mantêm a estrutura normal, a elasticidade e a integridade dos eritrócitos e sustenta a hemoglobina no estado ferroso, essencial para o transporte de oxigênio. A G6-PD e o NADPH são fatores chave para a proteção dos eritrócitos contra danos oxidativos. Nesta reação, a GSH é oxidada e a glutathiona redutase (GR) a regenera através da utilização de NADPH. O NADPH é oxidado e a G6-PD é necessária para produzir NADPH reduzido novamente (Figura 7) (URSINI *et al.*, 1997; FARHUD & YAZDANPANA, 2008).

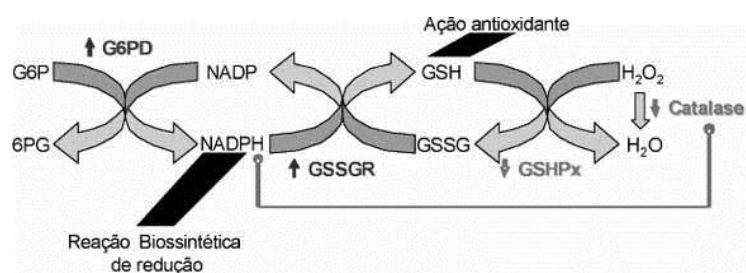


FIGURA 7 – DEFESA ANTIOXIDANTE DA G6-PD NOS ERITRÓCITOS
FONTE: CIANCIARULLO *et al.* (2011)

Legenda:	G6PD	=	Glicose 6 fosfato desidrogenase
	GSH	=	Glutathiona Reduzida
	GSSG GSS-	=	Glutathiona Oxidada
	GR	=	Glutathiona Redutase
	GSHPx	=	Glutathiona Peroxidase

A GSH, representada na Figura 8, é um tripeptídeo (*L*-γ-glutamil-*L*-cisteinilglicina), que se destaca como co-fator da família de enzimas glutathiona peroxidases (GPx). É um tampão redox sulfidrílico que mantém os resíduos cisteinila da hemoglobina e de outras proteínas do eritrócito no estado reduzido. As funções do GSH consideradas mais importantes nos eritrócitos são a desintoxicação de níveis baixos de H₂O₂ e a manutenção da integridade da célula. A falha nesta função resulta na formação de metemoglobina e consequente incapacidade do eritrócito de transportar oxigênio, além de causar uma variação na forma eritrocitária, impedindo sua passagem para órgãos vitais. Eritrócitos deficientes em GSH estão mais predispostos à destruição oxidativa e têm sobrevida diminuída (ROPER, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

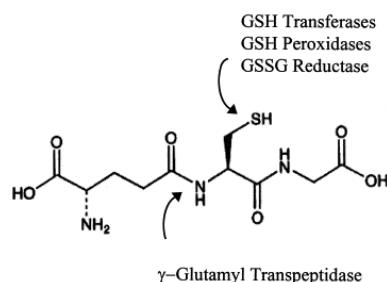
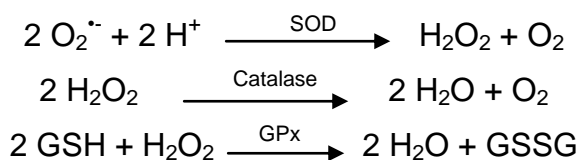


FIGURA 8 – GLUTATIONA (GSH)
FONTE: SIES (1999)

Entretanto, apesar de todos os mecanismos de proteção que a célula apresenta, sob certas circunstâncias estes falham e a hemoglobina torna-se não funcional, podendo ocorrer anemia. Essas alterações são particularmente susceptíveis de ocorrer se o eritrócito for exposto a compostos oxidantes ou toxinas, se os mecanismos intrínsecos de proteção estiverem defeituosos ou se anomalias genéticas na molécula de hemoglobina afetarem sua estabilidade (TELEN & KAUFMAN, 2004; LÓPEZ-REVUELTA *et al.* 2006).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos endogenamente ou absorvidos da dieta. Os antioxidantes produzidos pelo organismo são classificados em enzimáticos e não enzimáticos. A proteção enzimática baseia-se, quase que exclusivamente, na dismutação do ânion superóxido ou na decomposição do H_2O_2 e é representada pelas enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx (Figura 9) (BARREIROS *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007).



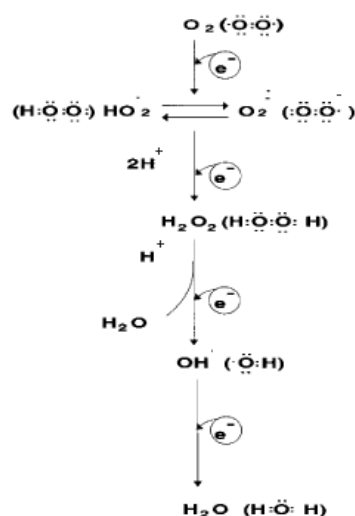


FIGURA 9 – ETAPAS NA REDUÇÃO UNIVALENTE DO OXIGÊNIO
E VIAS ENZIMÁTICAS QUE AFETAM OS INTERMEDIÁRIOS.
FONTE: FERREIRA & MATSUBARA (1997)

Os antioxidantes que agem não enzimaticamente são representados pela GSH, peptídeos de histidina, transferrina, ferritina, ceruloplasmina, coenzima Q10 e ácido úrico. Além dos antioxidantes produzidos, o organismo utiliza alguns provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos, onde se destacam os flavonóides (BARREIROS *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os sistemas antioxidantes evoluíram, em células e tecidos, para combater o estresse oxidativo. No entanto, os antioxidantes endógenos não são suficientes, em condições extremas de estresse oxidativo, tornando-se necessário recorrer a antioxidantes exógenos (CHAUDHURI *et al.*, 2007).

Quando as defesas antioxidantes eritrocitárias estão sobrecarregadas, a hemólise pode ocorrer devido à inabilidade dos eritrócitos em regenerar os componentes afetados (CLARO, 2006). Foi confirmado que a hemólise progressiva é acompanhada por um aumento na concentração de produtos secundários da peroxidação lipídica nos eritrócitos. A formação espontânea de metemoglobina está relacionada à geração de radicais superóxil, enquanto tipos instáveis da hemoglobina, como a HbS, HbH, HbE e HbF, são particularmente predispostos ao dano oxidativo. Esgotamento das defesas antioxidantes da célula e uma diminuição do pH no interior dos eritrócitos restringem o transporte normal de oxigênio (JO'Z'WIK *et al.*, 1997).

2.5 AGENTES OXIDANTES

2.5.1 *Terc*-Butilhidroperóxido (*t*BHP)

O *t*BHP (Figura 10) tem sido amplamente utilizado como pró-oxidante e alguns dos seus efeitos no metabolismo celular são mudanças na homeostase do cálcio, aumento de peroxidação lipídica e diminuição do potencial da membrana. Os mecanismos propostos para a ação do *t*BHP indicam depleção dos estoques celulares de GSH e oxidação de grupos SH e aglomerados de ferro e enxofre, funcionalmente importantes em enzimas; ou alterações da integridade da membrana induzida por peroxidação dos lipídeos (DRAHOTA *et al.*, 2005).

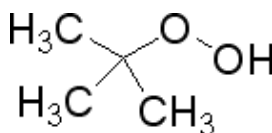


FIGURA 10 – *TERC*-BUTILHIDROPERÓXIDO

A exposição de eritrócitos humanos ao *t*BHP leva à oxidação da hemoglobina, com formação de metemoglobina e hemicromos, através de processos mediados por radicais livres catalisados pelo heme, envolvendo radicais *terc*-butoxil, cuja produção pode ser exacerbada na presença de Fe^{2+} e de heme proteínas (CESQUINI *et al.*, 2003; DOMANSKI *et al.*, 2005; LOPEZ-REVUELTA *et al.*, 2005).

Em eritrócitos contendo oxi e carboxihemoglobina, a oxidação de um elétron do ferro pelo *t*BHP implica em cisão heterolítica da ligação $\text{O} - \text{O}$ para formar os radicais *terc*-butoxil (*t*BHO) e *terc*-butilperoxil (*t*BHOO), capazes de abstrair um átomo de hidrogênio bis (alílico) de resíduos de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios da membrana. A formação destes produtos de oxidação resulta em redução da deformabilidade da membrana e vazamento de íons (TROTТА *et al.*, 1982; DEUTICKE *et al.*, 1987; VAN DER ZEE *et al.*, 1989; CESQUINI *et al.*, 2003; DOMANSKI *et al.*, 2005; LOPEZ-REVUELTA *et al.*, 2005; COMAR *et al.*, 2008).

A GSH fornece a primeira linha de defesa durante o estresse oxidativo induzido por hidroperóxidos orgânicos, removendo o *t*BHP e mediando o efeito protetor do desvio da hexose monofosfato. Provavelmente, a GSH metaboliza o

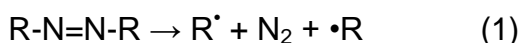
tBHP através da atividade da GPx, que parece aceitá-lo como substrato: (TROTTA *et al.*, 1982; ZAVODNIK *et al.*, 1998).



Em eritrócitos normais e saudáveis, a GSSG é reduzida rapidamente de volta a GSH pelo NADPH, em reação catalisada pela GR e 99% da glutatona total está na forma reduzida. No entanto, a reação do tBHP com a GSH, catalisada pela mesma enzima, é muito mais rápida do que sua reação espontânea (RABENSTEIN *et al.*, 1985).

2.5.2 Dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (AAPH)

O AAPH é uma molécula hidrofílica de um composto azo que se decompõem térmica e espontaneamente, gerando radicais de carbono e uma molécula de nitrogênio (Reação 1). O radical carbono reage com o oxigênio, instantaneamente (Reação 2), produzindo um radical peroxila, que ataca os lipídios de membranas e induz a oxidação em cadeia (NIKI *et al.*, 1991).



A meia-vida do AAPH (Figura 11) a 37°C é de vários dias e, sendo assim, este gera radicais livres em uma taxa constante, durante várias horas. A quantidade de radicais livres formados pode ser calculada e controlada pela variação de suas concentrações.

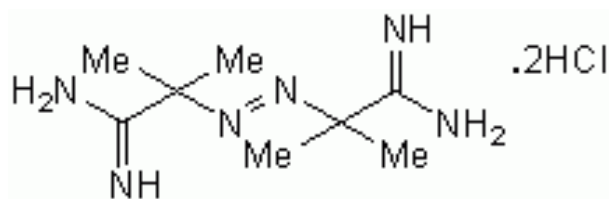
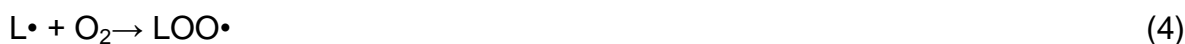


FIGURA 11 – AAPH

Niki *et al.* (1988) e Kondo *et al.* (1997) verificaram que o AAPH induz hemólise através da geração de radicais aquosos peroxil, por decomposição térmica aeróbica. Estes radicais induzem a oxidação de fosfolipídios e proteínas da membrana dos eritrócitos e o consumo de α -tocoferol e GSH endógenos, que acabam levando à hemólise. A extensão da hemólise é diretamente proporcional à quantidade dos radicais formados. A oxidação dos eritrócitos induzida por AAPH também forma hidroperóxidos lipídicos, uma quantidade considerável de hidroperóxido fosfatidilcolina (PCOOH) e uma pequena quantidade de hidroperóxido fosfatidiletanolamina (PEOOH), sugerindo que os radicais atacam a membrana eritrocitária externamente.

Fotomicrografias eletrônicas de transmissão focalizando eritrócitos, durante o dano oxidativo induzido por AAPH, mostram claramente os seus efeitos, pelo aspecto edemaciado das células, bem como pela presença de membranas quebradas, com vazamento de hemoglobina (NIKI, *et al.*, 1988).

Quando o AAPH é adicionado como iniciador, como representado abaixo, se decompõe a temperatura fisiológica, gerando radical alquila ($R'\bullet$) que, na presença de oxigênio, é convertido ao correspondente radical peroxil ($R'OO\bullet$) (Equações 1 e 2). O radical peroxil induz a oxidação de lipídios poliinsaturados na membrana dos eritrócitos, provocando uma reação em cadeia, conhecida como peroxidação lipídica (Equações 3 a 5). Como resultado, a membrana do eritrócito sofre danos rápidos e perde sua integridade, liberando hemoglobina com hemólise e liberação de íons K^+ intracelular (BANERJEE *et al.*, 2008).



Onde R representa $-C(Me)_2-C(NH_2)=NH_2^+$

2.6 SOBRECARGA DE FERRO

A sobrecarga de ferro pode ser definida como um aumento dos estoques deste metal, com ou sem dano tecidual, em geral classificada como primária ou secundária. A sobrecarga de ferro primária ocorre quando há defeito no processo de regulação da homeostasia do ferro no organismo e o teor no plasma excede a capacidade de ligação da transferrina. O exemplo mais conhecido é a hemocromatose hereditária, uma doença genética na qual o ferro é absorvido em excesso. A sobrecarga de ferro secundária a outras doenças genéticas ou adquiridas ocorre em doenças hepáticas crônicas, administração parenteral ou ingestão de quantidades excessivas de ferro. Os exemplos mais estudados são os de sobrecarga de ferro secundária às transfusões sanguíneas, resultante do aumento do catabolismo dos eritrócitos, como ocorre nas anemias hemolíticas ou por eritropoiese ineficaz (PIPERNO, 1998; ANDREWS, 1999; CANÇADO, 2007).

Nos seres humanos, a quantidade total de ferro corporal é normalmente mantida dentro da faixa de 200 a 1500 mg, por ajuste adequado da absorção intestinal. Porém, fisiologicamente, o organismo humano é incapaz de aumentar a excreção do ferro, mesmo em condições de sobrecarga. Estima-se que cada unidade de concentrado de hemácias contém de 200 a 250 mg de ferro e pacientes que recebem transfusões frequentes, em geral poderão ter um aumento da carga de ferro no organismo de 2 a 5 g por ano e desenvolver, inexoravelmente, sobrecarga de ferro (PIPERNO, 1998; ANDREWS, 1999; KUSHNER *et al.*, 2001; CANÇADO, 2007).

Dessa forma, a sobrecarga de ferro crônica representa uma séria complicação das transfusões sanguíneas. O excesso do ferro transfusional provoca acúmulo plasmático do ferro não ligado à transferrina, que se apresenta em uma forma instável e redox ativa, rapidamente absorvida pelas células (ESPOSITO *et al.*, 2003; SCHRIER & ANGELUCCI, 2005; CAPPELLINI *et al.*, 2006; FIBACH & RACHMILEWITZ, 2010).

Os efeitos fisiológicos e patológicos da sobrecarga de ferro estão relacionados aos danos oxidativos que podem ser gerados por esse ferro não ligado à transferrina, presumivelmente através da iniciação da reação de Fenton (Figura 12). O ferro em excesso se acumula nos tecidos que possuem os mais altos

níveis de receptores de transferrina, principalmente órgãos como fígado e coração e sistema endócrino (CAPPELLINI *et al.*, 2006; WALTER *et al.*, 2008; GREENBERG *et al.*, 2010).

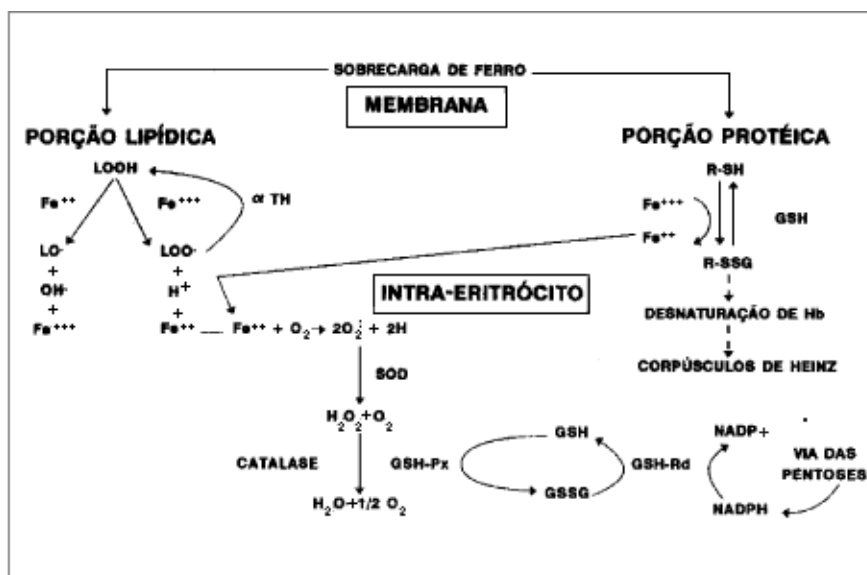


FIGURA 12 - MECANISMO DE LESÃO E PROTEÇÃO ERITROCITÁRIAS NA SOBRECARGA DE FERRO
 FONTE: FERREIRA & MATSUBARA (1997)

Sem tratamento adequado, após dez a vinte transfusões já é possível observar os sinais clínicos e laboratoriais decorrentes da sobrecarga de ferro. A doença cardíaca sintomática é a principal responsável pela morbimortalidade da maioria dos pacientes e pode ser observada cerca de dez anos após o início das transfusões sanguíneas. A doença hepática também é uma causa comum de morte nesses pacientes, sendo observada formação de colágeno e fibrose portal após dois anos do início das transfusões, com possível desenvolvimento de cirrose, na ausência de tratamento. Além dessas complicações, podem ocorrer distúrbios da maturação sexual, danos na tireóide, glândulas adrenais paratireóides, pâncreas exócrino, hipertensão pulmonar, dilatação do ventrículo direito e doença pulmonar restritiva (KUSHNER *et al.*, 2001; FABRON & TRICTA, 2003; CANÇADO, 2007).

Para avaliação da sobrecarga de ferro no organismo estão disponíveis várias técnicas, diretas e indiretas, dentre elas dosagem de ferritina sérica e determinação da concentração de ferro hepático através de biópsia, ressonância magnética ou espectroscopia (PIPERNO, 1998; ANDREWS, 1999; KUSHNER *et al.*, 2001;

FABRON & TRICTA, 2003; NEUFELD, 2006). A biópsia hepática tem sido o padrão-ouro para estudos de balanço de ferro, porém a técnica é invasiva, cara e sujeita a variabilidades (PIPERNO, 1998; NEUFELD, 2006). Apesar de a interpretação ser complicada por condições que podem alterar suas concentrações, a ferritina sérica ainda é o teste diagnóstico indireto mais usado na prática clínica (PIPERNO, 1998; KUSHNER *et al.*, 2001; FABRON & TRICTA, 2003; WORWOOD, 2006; CANÇADO, 2007).

Até o momento não existem dados brasileiros sobre a incidência e prevalência da sobrecarga de ferro. É possível fazer estimativas indiretas, mediante o cálculo da população que requer transfusão recorrente e, posteriormente, daqueles pacientes que poderão desenvolver sobrecarga de ferro (BRASIL, 2009). No âmbito mundial, o custo anual por paciente está estimado em US\$ 15.000,00 a 20.000,00 (BRITTENHAM, 2011).

2.7 ANEMIAS DEPENDENTES DE TRANSFUSÃO, PREDISPOSTAS À SOBRECARGA DE FERRO

A anemia é uma condição caracterizada por diminuição na capacidade do sangue em transportar oxigênio, determinada pela massa de eritrócitos circulantes. Como este valor não é facilmente medido, a definição prática de anemia está baseada na concentração de hemoglobina do sangue total. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define anemia como uma concentração de hemoglobina abaixo da faixa normal para a distribuição das concentrações encontradas em um grupo representativo de indivíduos (MCLELLAN *et al.*, 2003).

Nas anemias hemolíticas, a sobrevida eritrocitária está encurtada. Em algumas delas, a hemólise ocorre predominantemente no sistema reticuloendotelial, sendo denominada extravascular e, em outros distúrbios há um grau elevado de hemólise intravascular (LEWIS *et al.*, 2006).

As hemoglobinopatias são exemplos de doenças hemolíticas crônicas devido a alterações genéticas, com altas frequências populacionais e dependentes de procedimentos especializados de hemoterapia, em grande parte dos portadores de suas formas homozigotas. O diagnóstico e o tratamento precoce aumentam

significativamente a sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes pois, embora tratáveis, as hemoglobinopatias ainda são incuráveis (RAMALHO *et al.*, 2003).

Apesar da existência de centenas de hemoglobinopatias hereditárias, algumas delas exigem a implantação de programas de saúde pública no Brasil, pois, segundo dados da OMS, causam um alto grau de morbidade e mortalidade. Como exemplos são citadas a anemia falciforme, de importância nacional por sua alta frequência entre afro-descendentes e as talassemias, que possuem importância regional em virtude da alta frequência entre os descendentes de povos da região mediterrânea, como os italianos. Em 1992, o Ministério da Saúde criou o Comitê de Hemoglobinopatias, responsável pelas primeiras medidas de divulgação e de normatização do tratamento dessas doenças em nosso país (RAMALHO *et al.*, 2003).

2.7.1 Talassemias

As talassemias são um grupo de distúrbios hereditários caracterizadas por defeito na síntese de uma ou mais cadeias globínicas que formam o tetrâmero da molécula de hemoglobina. Há produção inadequada de hemoglobina, causando anemia se a compensação medular não ocorrer, bem como gerando acúmulo de cadeias globínicas pela falta de balanço com a síntese da cadeia afetada, o que causa eritropoiese ineficaz e hemólise (RICE-EVANS, 1990; WILD, 2006).

As talassemias são herdadas como alelos de um ou mais genes globínicos localizados no cromossomo 11 (cadeias β , γ e δ) ou 16 (cadeias α) e são mais comuns no litoral do Mediterrâneo, África e Ásia. Muitas mutações diferentes causam as talassemias, sendo que o efeito e as manifestações clínicas são variáveis dependendo da gravidade do defeito genético (WILD, 2006). Segundo a Associação Brasileira de Talassemia, existem cerca de 490 pacientes com β -talassemia maior no Brasil, sendo que a maior parte concentra-se na região sudeste (BRASIL, 2009).

Nas α -talassemias, o defeito primário é o desequilíbrio de biossíntese das cadeias α da globina, com excesso de cadeias β , γ , ou ambas, capazes de se associar e formar tetrâmeros parcialmente solúveis. Estes excessos de cadeias não-

α causam danos principalmente aos eritrócitos maduros e, em menor grau, aos precursores eritróides, levando a hemólise e eritropoiese ineficaz. As diferentes características das cadeias em excesso na α -talassemia e o número de genes afetados determinam a fisiopatologia e a gravidade da doença (BORGNA-PIGNATTI & GALANELLO, 2004). Assim, as formas da α -talassemia que podem ocorrer são o traço talassêmico α^+ , com apenas um gene defeituoso; o traço talassêmico α^0 , em que não funcionam dois genes; a hemoglobinopatia H (β_4), com três genes afetados; e a hidropsia fetal (γ_4), onde há defeito nos quatro genes (WILD, 2006).

As designações comumente usadas para descrever as síndromes β -talassêmicas são baseadas na gravidade clínica. A β -talassemia menor ou traço β -talassêmico caracteriza o estado heterozigoto, no qual o portador clássico é, normalmente, assintomático (RICE-EVANS, 1990; WILD, 2006). O diagnóstico é feito através da avaliação de história familiar positiva ou durante testes de triagem. A anemia é leve ou ausente, com aumento dos níveis de Hb A₂, aparentemente devido ao aumento da produção de cadeias δ no gene da talassemia. A Hb F aparece aumentada na metade dos pacientes e a distribuição dentro dos eritrócitos geralmente é heterogênea (BORGNA-PIGNATTI & GALANELLO, 2004).

A β -talassemia maior, a forma mais comum da doença, é uma anemia hereditária grave onde há supressão da formação de cadeias de β -globina e um acúmulo de cadeias α , que precipitam e formam inclusões intracelulares, com consequente eritropoiese ineficaz. Os eritrócitos chegam à circulação repletos de cadeias α precipitadas e são rapidamente removidos pelo sistema reticuloendotelial. A formação dos corpos de inclusão produz radicais livres, exercendo considerável estresse oxidativo. Estes corpos de inclusão podem interagir com a membrana e formar áreas localizadas de rigidez, diminuindo a deformabilidade do eritrócito talassêmico (RICE-EVANS, 1990; WILD, 2006).

Os dados laboratoriais iniciais na β -talassemia maior caracterizam-se por níveis de HbA₂ normais ou aumentados para 5 a 7%, Hb F variando de 10 a 100% com distribuição heterogênea entre os eritrócitos, e Hb A constituindo o restante. A contagem de reticulócitos é baixa, o VCM está tipicamente entre 60 e 70fl e o HCM entre 12 e 18 pg/célula. Na extensão sanguínea evidencia-se uma grande variação no tamanho e forma dos eritrócitos, com codócitos grandes e hipocrômicos, micrócitos, dacriócitos e eritroblastos (BORGNA-PIGNATTI & GALANELLO, 2004).

O termo β -talassemia intermédia designa um fenótipo talassêmico geralmente independente de transfusões, exceto em circunstâncias especiais como infecções, hiperesplenismo, períodos de crescimento rápido e gravidez (CAMASCHELLA & CAPPELLINI, 1995; BORGNA-PIGNATTI & GALANELLO, 2004). A gravidade é intermediária entre a β -talassemia maior e portadores assintomáticos. A desordem é heterogênea, a gravidade é variável e está relacionada a uma grande diversidade de genótipos (AESSOPOS et al., 2001). Alguns pacientes afetados por formas leves podem ser reconhecidos na segunda década de vida ou mais tarde e os níveis de hemoglobina e sua composição desempenham um papel importante no diagnóstico. A quantidade de Hb F pode ser extremamente variável, de 5 a 100% (CAMASCHELLA & CAPPELLINI, 1995).

Nas formas de talassemia intermedia verdadeiramente independentes de transfusão, anemia de grau leve e icterícia estão presentes, enquanto que o crescimento e o desenvolvimento permanecem normais. Hiperesplenismo e hematopoiese extramedular podem exacerbar a anemia e uma sobrecarga de ferro pode ser encontrada mesmo em pacientes não transfundidos, devido à eritropoiese ineficaz, destruição de eritrócitos periféricos e aumento da absorção intestinal de ferro (CAMASCHELLA & CAPPELLINI, 1995; BORGNA-PIGNATTI & GALANELLO, 2004).

As principais manifestações clínicas das talassemias são as anemias de gravidade variável, que se tornam aparentes no primeiro ano de vida. Para anemias severas, com níveis de Hb inferiores a 7 g/dl, transfusões sanguíneas regulares são absolutamente necessárias e a prática usual é a de transfundir hemáceas para o paciente afetado a cada três semanas, mantendo o nível de Hb entre 9 e 12 g/dl (SCHRIER & ANGELUCCI, 2005; COVAS et al., 2010).

Um programa de transfusão adequado pode prevenir a morte por anemia e permitir crescimento e desenvolvimento normais durante a infância. No entanto, as transfusões frequentes levam à sobrecarga de ferro e, na ausência de tratamento para remover o excesso de ferro, os pacientes regularmente transfundidos poderão desenvolver as complicações hepáticas, cardíacas ou endócrinas já na infância ou adolescência (BRITTENHAM et al., 1994). Na β -talassemia maior, a doença cardíaca relacionada ao ferro continua sendo a causa de morte mais comum, com sobrevivência de cinco anos em 48% dos pacientes (CANÇADO, 2007). Além disso, mais de 70%

dos pacientes adultos sofrem de hipogonadismo, osteoporose e desordens endócrinas (WALTER *et al.*, 2008).

Livrea *et al.* (1996) e Esposito *et al.* (2003) demonstraram que pacientes portadores de β -talassemia maior com sobrecarga de ferro apresentam elevados níveis de marcadores plasmáticos de estresse oxidativo e deposição de ferro instável na membrana plasmática dos eritrócitos, além de níveis diminuídos de alguns antioxidantes endógenos.

Atualmente, o único tratamento curativo definitivo disponível para as talassemias é o transplante alogênico de células tronco. Porém, os diferentes tipos de transplante ainda estão em estudo e, em alguns, foram observadas incidências relativamente altas de recorrência. No futuro, espera-se que as talassemias possam se beneficiar de terapias gênicas específicas, projetadas para superar o bloqueio na síntese de uma cadeia de globina específica (SCHRIER & ANGELUCCI, 2005).

2.7.2 Anemia Falciforme

A anemia falciforme é a doença hematológica hereditária mais frequente em todo o mundo. Em algumas partes da África, 45% da população apresenta traço falciforme e nos Estados Unidos, América Latina e Caribe, aproximadamente 8% dos negros carregam o gene da doença (WANG, 2004). O primeiro relato científico da doença foi descrito por Herrick, em 1910, em um estudante da Universidade das Índias Ocidentais, proveniente de Granada, na América Central (RUIZ, 2007).

No Brasil, a incidência é de 1 a 3 casos por 1000 recém-nascidos, ocorrendo predominantemente entre afro-descendentes (RAMALHO *et al.*, 2003). O Programa Nacional de Triagem Neonatal, do Ministério da Saúde, estima o nascimento anual de cerca de 3.500 crianças com a doença, sendo as maiores prevalências encontradas nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, Pernambuco, Minas Gerais e Maranhão (BRASIL, 2009). A distribuição é bastante heterogênea, dependendo da descendência da população, com prevalência de heterozigotos entre 6 e 10% nas regiões norte e nordeste e 2% a 3% nas regiões sul e sudeste (CANÇADO & JESUS, 2007).

A doença falciforme, causada por uma mutação no gene da β -globina, caracteriza um grupo de anemias hemolíticas crônicas, que ocorrem devido à substituição de uma adenina (A) por uma timidina (T) no códon 6 do gene da β -globina (GAG \rightarrow GTG), que resulta na substituição do resíduo normal de ácido glutâmico por valina, gerando a variante hemoglobina S (HbS \rightarrow $\alpha_2\beta_2^S$). Quando a oxigenação da célula diminui, as moléculas de desoxihemoglobina S se agregam em filamentos que precipitam como cristais, os quais conferem ao eritrócito a típica forma de foice, pela qual é denominado drepanócito (Figura 13) (BROVELLI, 1990; RICE-EVANS, 1990; WILD, 2006; STEINBERG, 2007).

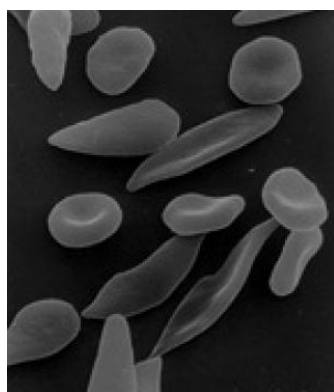


FIGURA 13 – ERITRÓCITOS DE PACIENTE COM ANEMIA FALCIFORME EXAMINADOS AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA
FONTE: WANG (2004)

A falcização não é um fenômeno instantâneo. Há fortes indícios de que a distorção das células contendo HbS é resultado da polimerização da hemoglobina e análises da cinética da falcização sugerem que esta polimerização molecular ocorre em etapas. Esta mudança menor na estrutura é responsável por mudanças profundas na estabilidade molecular e solubilidade (WANG, 2004).

Quando há oxigenação, a oxiemoglobina S se torna solúvel novamente e assim, a célula passa da forma de foice para a normal e vice-versa, repetidamente. A partir de certo ponto, no entanto, a membrana eritrocitária é afetada e a célula se torna irreversivelmente falcizada. Isto resulta em reduzida sobrevivência do eritrócito e oclusão microvascular, gerando manifestações clínicas como anemia e episódios vaso-oclusivos (BROVELLI, 1990; RICE-EVANS, 1990).

A alta rotatividade metabólica durante a polimerização e despolimerização após desoxigenação e reoxigenação, respectivamente, é uma fonte potencialmente

importante de produção de espécies reativas de oxigênio. Na anemia falciforme, o estresse oxidativo está envolvido em vários mecanismos fisiopatológicos, como hemólise acelerada, dano endotelial e hipercoagulabilidade, potencialmente contribuindo para a vaso-oclusão relacionada à doença e subsequentes danos em órgãos (NUR *et al.*, 2011).

Embora a doença atribuída à HbS seja observada já na primeira infância, os primeiros sintomas surgem na segunda metade do primeiro ano de vida. A falta de expressão clínica do genótipo Hb SS durante a vida fetal e início da pós-natal é explicado pela produção de uma quantidade suficiente de Hb F, limitando a falcização, que vai aumentando gradualmente. Uma anemia normocítica normocrômica moderada manifesta-se aos três meses de idade e persiste ao longo da vida. A concentração de Hb média é de 8,0 g/dl, variando entre 6,0 e 10,0 g/dl, de acordo com gênero e a idade (WANG, 2004).

Alguns pacientes podem apresentar hemólise mais severa, reticulocitose e elevação da lactato desidrogenase (LDH) sérica. A hemólise que ocorre é principalmente extravascular devido à eritrofagocitose pelas células reticuloendoteliais, que reconhecem o eritrócito falciforme danoso. Certas complicações da anemia falciforme, como hipertensão pulmonar, priapismo, úlceras nas pernas e acidente vascular cerebral, estão intimamente ligados à intensidade da hemólise, porém outras complicações, como episódios de dor e osteonecrose estão ligadas a alta viscosidade do sangue e a interações entre os eritrócitos falciformes, leucócitos e endotélio (STEINBERG, 2007).

Os eritrócitos falciformes demonstram elevada aderência ao endotélio vascular, monócitos, macrófagos e membranas lipídicas, comparados aos eritrócitos normais. Também podem gerar espontaneamente grandes quantidades de subprodutos da peroxidação lipídica, com potencial para formar ligações cruzadas entre proteínas. Ferro livre e hemicromos podem estar presentes nas superfícies das membranas de células falciformes, catalisando a formação de radicais livres e promovendo reações oxidativas (WANG, 2004).

A anemia falciforme resulta em complicações agudas e insuficiência progressiva de múltiplos órgãos. Uma das medidas terapêuticas mais eficazes atualmente disponíveis é a transfusão de hemáceas, que facilita a oxigenação dos tecidos e reduz o número de eritrócitos contendo HbS e as complicações associadas

à doença, diminuindo a frequência total de internações, eventos vaso-oclusivos, síndrome torácica aguda e falha do crescimento (WANG, 2004; VICHINSKY *et al.*, 2006; CANÇADO, 2007).

Entretanto, as transfusões frequentes podem gerar sobrecarga de ferro, aloimunização, perda de acesso venoso e infecções virais (STEINBERG, 2007). A sobrecarga de ferro está claramente associada com morbidade e mortalidade nesses pacientes, tanto quanto para os portadores de talassemias (VICHINSKY *et al.*, 2006). Apesar de as complicações induzidas pelo ferro parecerem se desenvolver mais tarde na anemia falciforme, eventualmente, doença hepática com cirrose e deposição de ferro no coração e no pâncreas podem se desenvolver (BRITTENHAM, 2011).

O prognóstico para pessoas com anemia falciforme têm passado por mudanças dramáticas como resultado da triagem neonatal para a doença, diagnóstico precoce, educação do paciente e intervenções terapêuticas. Em uma revisão retrospectiva dos casos nos Estados Unidos, a porcentagem de óbitos passou de 20 a 30% em menores de 5 anos de idade em 1972, para uma taxa de sobrevivência de 85% aos 20 anos de idade, em 1989 (WANG, 2004). O transplante de medula óssea de sucesso pode curar a anemia falciforme, tendo uma taxa de mortalidade que varia entre 5 e 10% (STEINBERG, 2007).

2.7.3 Outras Anemias Dependentes de Transfusão

As síndromes mielodisplásicas (SMD) constituem um grupo heterogêneo de distúrbios hematológicos onde ocorrem desordens de clones de células tronco, caracterizadas por hematopoiese ineficaz e consequentes citopenias periféricas (SOUTO, 2006; ROSE *et al.*, 2010). O tratamento das SMD varia de acordo com o grupo de risco, mas cerca de 80 a 90% destes são dependentes de transfusões sanguíneas, desta forma, a sobrecarga de ferro é inevitável, podendo levar a danos teciduais graves (BADAWI *et al.*, 2010; GHOTI *et al.*, 2010).

A grande maioria dos estudos disponíveis a respeito da sobrecarga de ferro transfusional está focado nas doenças que mais comumente apresentam essa consequência, já descritas. No entanto, várias outras doenças, apesar de mais

raras, podem apresentar dependência transfusional para combater a anemia. Dentre estas podemos citar anemia de Diamond-Blackfan, anemia aplástica, α -talassemia, anemia sideroblástica, mielofibrose, aplasia pura de células vermelhas, deficiência de piruvatoquinase, anemia hemolítica auto-imune, anemia de Fanconi e eritropenia (PORTER *et al.*, 2007).

2.8 TERAPIA QUELANTE DE FERRO

A sobrecarga de ferro pode ser tratada ou evitada com a administração de um agente quelante capaz de complexar com este metal e promover sua excreção. A eficácia do agente quelante depende da sua capacidade de ligação ao ferro livre no plasma, por períodos de tempo sustentáveis (KUSHNER *et al.*, 2001). O tratamento visa remover o ferro, sem a redução da hemoglobina do paciente (COVAS, 2010), sendo que, claramente, o papel dos quelantes é proteger os eritrócitos das reações de Fenton e de Haber-Weiss (JO'Z'WIK *et al.*, 1997).

O uso da terapia quelante para a prevenção e tratamento da sobrecarga transfusional tem sido o principal fator que altera o prognóstico dos pacientes transfundidos regularmente, sendo indispensável para sua sobrevivência. Quanto maior o acúmulo de ferro, maiores os riscos de morbidade e mortalidade e quanto melhor a quelação, melhor a qualidade de vida dos pacientes (KUSHNER *et al.*, 2001; FABRON & TRICTA, 2003; CANÇADO, 2007; BRITTENHAM, 2011).

Apenas uma pequena proporção do ferro no organismo está disponível para quelação imediata, sendo o ferro quelável aquele que fica disponível a partir do catabolismo contínuo da hemoglobina dos eritrócitos e o disponibilizado dentro das células a partir da quebra contínua de ferritina dentro dos lisossomos. A decisão de quando tratar a sobrecarga depende dos níveis de ferro livre no organismo e da duração da exposição ao excesso de ferro. Além disso, alguns tecidos, como os cardíacos, são mais suscetíveis aos danos, pois a insuficiência cardíaca ocorre em níveis de ferro teciduais mais baixos, em relação à cirrose (PORTER *et al.*, 2001).

A dose de um agente quelante é determinada pela presença ou ausência de sobrecarga de ferro cardíaco, a principal causa de morte nesses casos. No entanto, outros resultados de morbidade devem ser considerados, como a prevenção de

complicações como diabetes, hipogonadismo, crescimento debilitado e hipotireoidismo, principalmente se a sobrecarga ocorre na infância. Na ausência de sobrecarga no coração, o objetivo em longo prazo é manter o ferro do organismo em um nível que permita o armazenamento seguro evitando, ao mesmo tempo, a toxicidade pelo quelante (PORTER *et al.*, 2001; BRITTENHAM, 2011).

Os agentes quelantes devem apresentar ampla margem de segurança terapêutica, minimizando a inibição de enzimas-chave e efeitos citotóxicos. Além disso, devem ter maior especificidade pelo ferro do que por outros metais e ocasionar alta estabilidade do complexo ferro-quelante. Quelantes com baixo peso molecular e alta lipofilicidade tendem a interagir com as reservas metabólicas de ferro mais rapidamente do que moléculas maiores e mais hidrofílicas (KUSHNER *et al.*, 2001).

Até o final da década de 90, o único agente disponível para uso clínico era a desferoxamina (DFO), cuja administração parenteral e especificidade relativa para o íon férrico motivou a procura e o desenvolvimento de novos medicamentos, que apresentassem eficácia e segurança semelhantes, porém de administração oral. Entre centenas de compostos estudados, a deferiprona (L1) e, mais recentemente, o deferasirox (DFX) passaram a fazer parte do arsenal terapêutico disponível para o tratamento de pacientes com sobrecarga de ferro (KUSHNER *et al.*, 2001; FABRON & TRICTA, 2003; CANÇADO, 2007).

De acordo com dados de 2009 do Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde (BRATS) do Ministério da Saúde, uma comparação do custo do tratamento mensal da sobrecarga de ferro, em um paciente de 70 kg, mostra que para a DFO seria de R\$ 6.524,00 a 11.874,00, para doses de 20 e 60 mg/kg/dia, respectivamente, considerando-se o custo mensal da bomba de infusão. Para a L1, o custo mensal seria de R\$ 2.764,00, para dose de 75 mg/kg/dia e para o DFX seria de R\$ 3.322,00 a 9.968,00, para doses de 10 e 30 mg/kg/dia, respectivamente.

2.8.1 Desferoxamina

A desferoxamina (Desferal[®], Novartis, Suíça) foi introduzida no início da década de 70 e continua sendo o agente quelante de ferro mais utilizado como tratamento padrão em pacientes com sobrecarga de ferro transfusional. Nestes pacientes o uso adequado do medicamento associado às transfusões sanguíneas regulares tem proporcionado redução das complicações hepáticas e endócrinas, normalização do crescimento, prevenção da doença cardíaca e melhora da qualidade de vida e da sobrevida (NEUFELD, 2006; CANÇADO, 2007).

A molécula da desferoxamina (DFO), cuja fórmula estrutural está representada na Figura 14, um ácido tri-hidroxâmico produzido e purificado a partir de *Streptomyces pilosus*, apresenta elevado peso molecular e hidrofiliabilidade, sendo captada lentamente pelas células e compartimentos sub-celulares. Devido ao seu tamanho, a DFO é mal absorvida pelo intestino e metabolizada no fígado em metabólitos de ligação de ferro. Desta forma, deve ser administrada por via subcutânea ou endovenosa, geralmente com uma bomba portátil, de 8 a 10 h por dia, durante 5 a 7 dias por semana. Prefere-se a administração subcutânea exceto em pacientes com deposição de ferro cardíaco grave, para os quais a terapia intravenosa contínua é preferida (KUSHNER *et al.*, 2001; PORTER *et al.*, 2001; NEUFELD, 2006; VICHINSKY *et al.*, 2006; CANÇADO, 2007; BRITTENHAM, 2011).

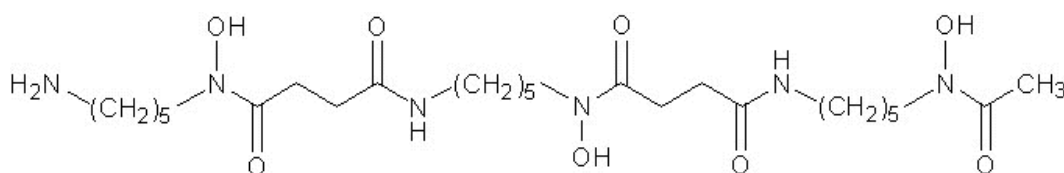


FIGURA 14 – MOLÉCULA DA DESFEROXAMINA

Uma molécula do quelante liga um átomo de ferro, formando um complexo altamente estável, a ferroxamina, praticamente inerte metabolicamente (PORTER *et al.*, 2001). Dentro das células, a DFO se localiza nos lisossomos, onde induz a degradação da ferritina citosólica, que libera o ferro citosólico para ser quelado pela DFO e eliminado da célula. A captação nos hepatócitos é rápida, tornando o acesso ao ferro intra-hepático relativamente eficiente (KUSHNER *et al.*, 2001; NEUFELD, 2006; BRITTENHAM, 2011).

A DFO apresenta uma meia-vida plasmática curta, de apenas 0,3 h, sendo eliminada rapidamente na urina e na bile. O metabolismo ocorre, na sua maior parte, no interior dos hepatócitos por desaminação oxidativa do N-terminal. O ferro ligado à DFO torna-se praticamente inativo e a droga pode impedir ou reverter os efeitos da formação de radicais livres e peroxidação de lipídios. O ferro na urina é derivado daquele lançado após a lise dos eritrócitos no interior dos macrófagos, enquanto o ferro fecal é derivado de ferro quelado dentro do fígado (KUSHNER *et al.*, 2001; PORTER *et al.*, 2001; NEUFELD, 2006; CANÇADO, 2007)

A eficácia da DFO depende de vários fatores como dose, via e duração de administração, grau de sobrecarga e concentração de vitamina C, que aumenta a excreção à medida que eleva a disponibilidade de ferro susceptível à quelação (PORTER *et al.*, 2001).

Atualmente, os efeitos tóxicos resultantes da superdosagem de DFO são raros, desde que os esquemas de dosagem sejam adequados ao paciente. As principais reações adversas relacionadas à DFO são desconforto, dor ou reação inflamatória no local de aplicação, alterações sensoriais neurais, oculares e auditivas e retardo de crescimento. Existe um risco aumentado de infecção, principalmente pela *Yersinia* spp, porque o complexo ferrioxamina pode ser usado pela bactéria como fonte de ferro para o seu crescimento (PORTER *et al.*, 2001; FABRON & TRICTA, 2003; BRITTENHAM, 2011).

O uso da terapia com DFO antecede o uso de ensaios randomizados e controlados para estabelecer a eficácia de tratamentos médicos. Por este motivo, seus efeitos têm sido investigados em estudos observacionais. Foi demonstrado, em estudos realizados com pacientes talassêmicos, que o uso da DFO diminuiu efetivamente a carga de ferro corporal e reduziu os riscos de intolerância à glicose, diabetes mellitus, doença cardíaca e morte, causando aumento progressivo na taxa de sobrevivência (BRITTENHAM *et al.*, 1994).

A literatura traz evidências de melhora na sobrevida dos pacientes em tratamento com DFO, no entanto, a via de administração parenteral limita a adesão dos pacientes. Cerca de 60% deles não consegue realizar o tratamento de forma adequada e essa falta de adesão é a principal causa de insucesso da terapia. Pacientes que recebem infusões subcutâneas mais de 250 vezes por ano têm 95% de sobrevivência aos 30 anos de idade, enquanto que esta sobrevida é de apenas

12% naqueles que não conseguem atingir essa meta (PORTER *et al.*, 2001; NEUFELD, 2006; VICHINSKY *et al.*, 2006; CANÇADO, 2007; WALTER *et al.*, 2008).

A DFO está registrada no Brasil desde 1981 e é indicada em casos de sobrecarga de ferro em pacientes acometidos por β -talassemia, doença falciforme e síndrome mielodisplásica, assim como outras anemias dependentes de transfusões sanguíneas recorrentes e enfermidades que aumentam a concentração de ferro. Normalmente, em sobrecarga estabelecida, a dose é de 20 a 60 mg/kg/dia. No contexto do Sistema Único de Saúde (SUS), a distribuição do aparelho é feita em regime de comodato para que o paciente possa utilizá-lo em casa (BRASIL, 2009).

2.8.2 Deferiprona

A despesa e a inconveniência do tratamento com DFO levou a uma constante busca por quelantes do ferro ativos por via oral. Inicialmente, o único agente que alcançou resultados em ensaios clínicos foi o 1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridona, a deferiprona (Ferriprox[®], Apotex, Canadá), um quelante sintético disponível para uso clínico desde 1987 e comercializado a partir de 1995 (KUSHNER *et al.*, 2001; FABRON & TRICTA, 2003; NEUFELD, 2006; CANÇADO, 2007).

A molécula da deferiprona (L1), cuja fórmula estrutural está representada na Figura 15, é bivalente, de modo que são necessárias três moléculas para ligar uma molécula de ferro. Quanto às propriedades farmacocinéticas, a L1 administrada por via oral é absorvida rapidamente pelo trato gastrointestinal e tem acesso a estoques intracelulares de ferro, pois apresenta cerca de um terço do peso molecular da DFO, carga neutra e relativa lipofilicidade. O acesso ao ferro é mais rápido, porém o complexo formado é menos estável (KUSHNER *et al.*, 2001; PORTER *et al.*, 2001; NEUFELD, 2006; CANÇADO, 2007).

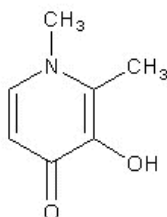


FIGURA 15– MOLÉCULA DA DEFERIPRONA

A L1 aparece no plasma depois de 5 a 10 min da sua ingestão, alcançando concentrações plasmáticas máximas entre 45 e 60 min, mas o tempo de meia vida é bastante curto, de apenas 1,52 h, devendo ser administrada três vezes ao dia. Aproximadamente 85% da dose ingerida é metabolizada na forma de um conjugado glucoronídeo inativo, excretado na urina juntamente com os complexos deferiprona:ferro. A excreção fecal do ferro corresponde, em média, a 20% do total eliminado e a excreção urinária da L1 não é influenciada pela administração de vitamina C. A quantidade de ferro excretada é diretamente proporcional à dose do medicamento e ao grau de sobrecarga de ferro do paciente (KUSHNER *et al.*, 2001; PORTER *et al.*, 2001; FABRON & TRICTA, 2003; CANÇADO, 2007).

Os efeitos adversos mais comumente relatados são diarreia e efeitos gastrointestinais, artropatia incluindo artrite severa, aumento dos níveis de enzimas hepáticas e progressão da fibrose hepática associada a um aumento da sobrecarga de ferro ou hepatite C. Os efeitos adversos mais graves são agranulocitose, com incidência de 1,1% e neutropenia, cuja incidência é de 4,9% (BRITTENHAM, 2011). Foi descrito efeito teratogênico da L1 em animais (PORTER *et al.*, 2001).

Com a descoberta da L1 e a constatação da sua eficácia como agente quelante por via oral, este medicamento passou a ser utilizado em muitos países antes mesmo da comprovação de sua segurança. Os ensaios clínicos foram realizados após sua comercialização e a maioria deles utilizou apenas pacientes com β -talassemia maior, uma vez que esse medicamento não foi aprovado para uso em outras doenças (CANÇADO, 2007). Contudo, a L1 não foi aprovada para uso nos Estados Unidos e no Canadá. Na União Européia e em alguns outros países, incluindo o Brasil, foi aprovada especificamente para pacientes com β - talassemia

maior, nos casos em que a DFO é contra-indicada ou inadequada (SCHRIER, 2005; BRITTENHAM, 2011).

No final da década de 90 houve uma controvérsia sobre a segurança da L1 por causa da ocorrência de fibrose hepática durante uma investigação clínica. Em um estudo descreveu-se a progressão da fibrose hepática durante o tratamento e, em outro, a fibrose hepática foi encontrada em 7 de 11 pacientes em tratamento em longo prazo. No entanto, em outros relatórios não se demonstrou progressão da fibrose e em estudos posteriores esse problema não tem sido focalizado como uma questão de toxicidade significativa (PORTER *et al.*, 2001; FABRON & TRICTA, 2003; NEUFELD, 2006).

De acordo com Kushner *et al.* (2001), na maioria dos estudos com L1 estimou-se as mudanças no ferro do organismo usando-se a concentração de ferritina sérica, sendo que em poucos se avaliou os estoques de ferro tecidual. Além disso, em um estudo comparativo, randomizado, constatou-se curta efetividade da L1 em relação à de DFO e vários pacientes morreram acometidos de doença cardíaca durante a terapia com L1. Schrier (2005) descreve que a L1, apesar de ser capaz de remover o ferro do coração e melhorar doenças cardíacas, é menos eficaz do que a DFO na prevenção do acúmulo de ferro hepático e pode causar artralgia e neutropenia.

No entanto, de acordo com Fabron & Tricta (2003) em diversos estudos demonstrou-se a eficácia ferroquelante da L1 e sua capacidade de reduzir a quantidade de ferro no fígado e no coração e melhorar a qualidade de vida dos pacientes, sendo igualmente eficaz à DFO. Esposito *et al.* (2003) demonstraram que a L1 diminuiu a atividade da peroxidação lipídica e aumentou a proteção contra lesão oxidativa em células de talassêmicos com sobrecarga de ferro. Borgna-Pignatti *et al.* (2006) e Pennell *et al.* (2006) demonstraram que a L1 foi superior a DFO na redução de doença e morte cardíacas.

Tem sido demonstrado que a DFO e a L1 têm características diferentes para a quelação do ferro em diversos órgãos. Como a molécula de DFO sofre alterações de conformação na ligação com o ferro, a quelação somente pode ocorrer se houver uma via de excreção ativa, como postulado para os hepatócitos. Portanto, a DFO tem acesso preferencial ao ferro hepático enquanto que a molécula de L1 é mais

efetiva na remoção do ferro cardíaco, intracelular (FABRON & TRICTA, 2003; PENNELL *et al.*, 2006).

Desta forma, alguns clínicos têm investigado o uso de terapia combinada de DFO e L1, concomitantemente ou sequencialmente. Estudos metabólicos demonstram que o uso combinado dos quelantes proporciona um efeito aditivo e possivelmente sinérgico na excreção de ferro (PORTER *et al.*, 2001; FABRON & TRICTA, 2003; NEUFELD, 2006).

A L1 teve seu registro concedido pela ANVISA em 2002, sendo indicada para o tratamento do excesso de ferro em pacientes com β -talassemia maior para os quais a terapia de quelação com a DFO não é recomendada. Em adultos e crianças acima de dez anos, a posologia da deferiprona é de 25mg/kg, três vezes ao dia, ou seja, dose máxima de 75mg/kg/dia (BRASIL, 2009).

2.8.3 Deferasirox

O Deferasirox (Exjade[®], Novartis, Suíça), cuja fórmula estrutural está representada na Figura 16, resulta de um programa de descoberta combinado, tendo sido submetido a extensivos testes de segurança, ensaios clínicos e estudos de eficácia em adultos e crianças portadoras de uma variedade de anemias crônicas dependentes de transfusão, intolerantes ao DFO. Nestes estudos demonstrou-se que o medicamento é bem tolerado em todas as faixas etárias e mantém ou reduz a concentração de ferro no tecido hepático e no miocárdio (NEUFELD, 2006; VICHINSKY *et al.*, 2006).

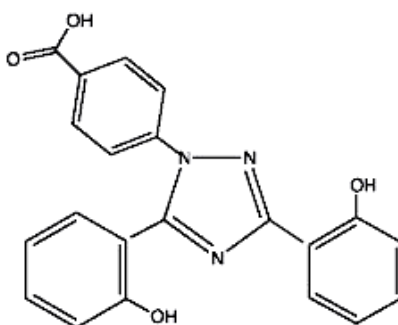


FIGURA 16 – MOLÉCULA DO DEFERASIROX

Este quelante pertence a uma nova classe de N-substituídos hidroxifeniltriazólicos que contém três sítios de interação polar no domínio de união com o ferro, sendo necessárias duas moléculas para quelar uma molécula deste metal. Apresenta elevada afinidade e especificidade pelo ferro e sua eficácia é proporcional à dose administrada (NEUFELD, 2006; CANÇADO, 2007).

O deferasirox (DFX), após administração oral, atinge a concentração plasmática em um tempo médio de 1,5 a 4 h e a meia-vida plasmática estimada está entre 8 e 16 h, sendo capaz de prover quelação eficaz por 24 h, mesmo com dose baixa. Esta propriedade farmacocinética permite a sua administração apenas uma vez ao dia (NEUFELD, 2006; CANÇADO, 2007; BRUIN *et al.*, 2008; EXJADE, 2009).

A biodisponibilidade absoluta do DFX é de $73,5 \pm 12,8\%$ e se liga fortemente a proteínas plasmáticas. A glucuronidação, com subsequente excreção biliar, é a principal via metabólica, sendo a metabolização pelas enzimas oxidativas do citocromo P450 negligenciável, apenas 8%. Estudos experimentais em ratos mostraram que as principais vias metabólicas foram glucuronidação direta que produziu os metabólitos M3 e M6, hidroxilações nos anéis de fenol que resultaram nos metabólitos M1, M2, M4 e M5 e conjugação dos metabólitos hidroxilados com ácido glicurônico ou sulfato. O metabólito principal presente na bile, M3, mantém a capacidade de formar complexo com o ferro e o mesmo ocorre com M1 e M2, mas em proporção bem menor (BRUIN *et al.*, 2008; EXJADE, 2009).

No fígado, o DFX liga-se com o ferro formando o complexo $\text{Fe}(\text{DFX})_2$. O padrão de distribuição observado é típico de um composto de ácido orgânico, e tanto o DFX como seu complexo com o ferro são eliminados rapidamente, principalmente por via biliar. A excreção ocorre primariamente nas fezes, representando 84% da dose, sendo a excreção renal mínima, apenas 8% da dose (BRUIN *et al.*, 2008; EXJADE, 2009; BRITTENHAM, 2011).

Quanto à segurança, o DFX foi geralmente bem tolerado em todas as faixas etárias, com apenas 3% de abandono por eventos adversos. Nos testes clínicos, os efeitos adversos mais comuns foram distúrbios gastrointestinais, que incluíram dor abdominal, náuseas e vômitos, diarreia e constipação, além de erupções cutâneas. Leves aumentos transitórios dose-dependentes na creatinina sérica foram observados, além de elevações nos testes de função hepática em poucos pacientes. Não se registrou nenhum caso de agranulocitose, artropatia, retardo de crescimento

ou alterações ósseas (NEUFELD, 2006; VICHINSKY *et al.*, 2006; CAPPELLINI *et al.*, 2006; BRITTENHAM, 2011).

Em novembro de 2005, o *Food and Drug Administration* (FDA) e a *Swissmedic* aprovaram o uso do DFX no tratamento de pacientes, a partir de 2 anos de idade, com sobrecarga de ferro transfusional e diagnóstico de anemia hereditária ou adquirida dependentes de transfusões sanguíneas. Em 2006, decisão semelhante foi tomada nos países da União Européia e América Latina, incluindo o Brasil (NEUFELD, 2006; CANÇADO, 2007).

O medicamento teve seu registro concedido pela ANVISA em 2006. A patente da molécula foi concedida em 2005 pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), sendo válida até 2017. O medicamento está disponível na forma de comprimido dispersível, com administração única diária, 30 min antes da ingestão de alimentos. A dose recomendada é de 10 a 30 mg/kg/dia (BRASIL, 2009).

Cappellini *et al.* (2006) e Vichinsky *et al.* (2006) demonstraram efeitos semelhantes na redução de ferro hepático e concentração líquida de ferro no organismo tanto com DFX como com DFO em portadores de β -talassemia e anemia falciforme.

Glickstein *et al.* (2006) compararam a ação dos quelantes DFO, L1 e DFX em reduzir danos cardíacos e demonstraram efeitos positivos com todos eles, porém os quelantes orais superam a DFO no acesso aos cardiomiócitos, comprovando a eficácia ferroquelante do DFX. Walter *et al.* (2008) concluíram que uma diminuição da carga de ferro no organismo foi associada a redução de dano oxidativo e inflamação, sendo esses parâmetros controlados por DFX tão eficazmente quanto ou melhor do que por DFO.

Ghoti *et al.* (2010) e Greenberg *et al.* (2010) demonstraram benefícios em curto prazo da quelação de ferro com DFX, na diminuição de parâmetros de sobrecarga de ferro e estresse oxidativo, em pacientes portadores de SMD.

Bendova *et al.* (2010) compararam a eficácia de vários quelantes de ferro na proteção de células cardíacas contra lesões oxidativas induzidas por tBHP e demonstraram que todos os quelantes testados eram capazes de gerar citoproteção significativa, porém, a DFO, por ser hidrofílica e possuir baixa permeabilidade às membranas celulares, exerceu pequena proteção apenas em concentrações muito altas. No entanto, os quelantes menores e mais lipofílicos, como a L1 e o DFX foram

mais eficazes na prevenção contra a lesão oxidativa nas células. A ação citoprotetora de todos os quelantes eficazes foi completamente perdida após a formação dos complexos com o ferro, confirmando a quelação como um mecanismo de ação protetora.

Tem sido relatado, em pacientes portadores de anemias adquiridas, uma melhora nas citopenias após início da terapia quelante de ferro, manifestada clinicamente por uma diminuição da necessidade de transfusões. Os possíveis mecanismos ainda não são claros, mas demonstrou-se que o ferro possui um efeito supressor sobre progenitores eritróides, *in vitro*. Desta forma, a terapia quelante poderia reduzir o estresse oxidativo, alterando níveis intracelulares de fatores de transcrição, que aumentam os níveis de eritropoietina. Badawi *et al.* (2010) demonstraram que o DFX induziu uma redução significativa na atividade desses fatores de transcrição, em células mononucleares de pacientes com SMD, mas o mesmo efeito ainda não foi observado com DFO e L1.

Em uma análise de custo-efetividade foram comparados o DFX com a DFO no tratamento de pacientes com sobrecarga de ferro transfusional, na perspectiva do sistema de saúde dos Estados Unidos. Os resultados desta análise permitiram presumir que a adesão ao tratamento com DFX foi superior à DFO, com 74% *versus* 64% e o risco de doença cardiovascular e consequente mortalidade foram inversamente relacionados à adesão ao tratamento (BRASIL, 2009).

Nesta análise, realizada por Delea *et al.* (2007), observou-se que, levando-se em consideração todos os gastos do tratamento, os benefícios clínicos do DFX são obtidos com um custo adicional de expectativa de vida por paciente, devido a um aumento nos custos de aquisição do medicamento e a relação custo-eficácia do DFX em relação à DFO está fora do aceitável. Porém, assumindo-se que, a cada ano, surgem 20 novos casos de β -talassemia maior na América do Norte, este impacto orçamental seria pequeno comparado à melhoria na qualidade de vida.

Cappellini *et al.* (2007) e Vichinsky *et al.* (2008) realizaram estudos que compararam a satisfação, a conveniência e preferência de pacientes portadores de β -talassemia e de anemia falciforme, respectivamente, pelos tratamentos com DFX e DFO. Os resultados indicaram satisfação, comodidade e preferência dos pacientes significativamente maiores para doses diárias por via oral de DFX que para infusões de DFO. As implicações destes resultados são de que a facilidade de administração

do DFX resulta em mais pacientes que aderem ao tratamento, proporcionando maiores benefícios da quelação e melhora na qualidade de vida do paciente, levando à melhores resultados na saúde em longo prazo (CAPPELLINI *et al.*, 2007; VICHINSKY, *et al.*, 2008).

Embora o DFX não seja tão permeável como a L1, a molécula pode facilmente penetrar nos miócitos e se combinar com o ferro. Como resultado, alguns clínicos estão testando o uso de DFO combinado com DFX para pacientes com equilíbrio de ferro positivo ou que respondem lentamente à monoterapia com DFX. Otto-Duessel *et al.* (2008) avaliaram a segurança e a eficácia dessa terapia combinada, porém os resultados foram ainda inconclusivos.

No contexto das anemias crônicas dependentes de transfusões regulares, a aprovação do DFX está sendo apresentada como um grande avanço e uma opção de tratamento. Entretanto, para muitos usuários de DFO com boa adesão e concentrações de ferro em intervalos de segurança o DFX não vem sendo uma opção, até que mais dados estejam disponíveis (NEUFELD, 2006). Desta forma, vários estudos ainda são necessários para avaliar os efeitos deste novo quelante em comparação com o tratamento padrão para comprovar seus efeitos benéficos, nos mais variados parâmetros, permitindo assim a substituição da terapia e a melhora na qualidade de vida dos pacientes.



3. OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação dos quelantes de ferro desferoxamina e deferasirox como protetores no metabolismo oxidativo, *in vitro*, dos eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes portadores de sobrecarga de ferro transfusional.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar as alterações no metabolismo oxidativo de eritrócitos submetidos à sobrecarga oxidativa, *in vitro*;
- Comparar o metabolismo oxidativo de eritrócitos normais e de indivíduos portadores de anemias dependentes de transfusão, com sobrecarga de ferro;
- Avaliar e comparar os possíveis efeitos protetores de desferoxamina e deferasirox no metabolismo oxidativo de eritrócitos normais, *in vitro*, e em eritrócitos de pacientes em tratamento com os quelantes, *in vivo*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Reagentes

Foram utilizados os reagentes *terc*-butilhidroperóxido (*t*BHP), dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (AAPH), ácido metafosfórico e ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (reagente DTNB), obtidos da SIGMA-ALDRICH; NaCl, Na₂HPO₄, KCl, saponina, ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico e NaOH, da VETEC; EDTA dissódico, da QEEL; e KH₂PO₄, da SYNTH. Para determinação da atividade enzimática da G6-PD foi utilizado kit da RANDOX.

Os fármacos desferoxamina e deferassirox, utilizados para tratamento de eritrócitos normais, *in vitro*, foram gentilmente doados pela NOVARTIS.

4.1.2 Amostras de Sangue

O material utilizado nesta pesquisa compreende amostras de sangue venoso de indivíduos dos grupos: controle, indivíduos que não apresentavam histórico de doença hematológica ou faziam qualquer tratamento medicamentoso; DFO/L1, pacientes portadores de β -talassemia maior atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), submetidos a tratamento com os quelantes de ferro desferoxamina e deferiprona; DFX, pacientes portadores de anemia falciforme ou β -talassemia maior, atendidos no HEMEPAR, submetidos a tratamento com o quelante de ferro deferassirox. Também foram analisadas amostras de pacientes portadores de anemia falciforme ou β -talassemia intermédia, não submetidos a tratamento quelante. Este material foi obtido após a conscientização dos indivíduos sujeitos da pesquisa ou seus responsáveis e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo I), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em 22 de setembro de 2010, sob registro CEP/SD: 979.104.10.08 e CAAE: 3862.0.000.091-10 (Anexo II).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Coleta do Material

Para a fase preliminar de padronização das técnicas e também para constituir o grupo controle foram coletados 10 ml de sangue venoso, em anticoagulante EDTAK₂, de 10 indivíduos considerados normais, professores ou funcionários da UFPR, voluntários, selecionados aleatoriamente, após esclarecimentos e assinatura do TCLE.

As amostras dos pacientes foram coletadas no HEMEPAR, quando os mesmos se apresentavam para a consulta de rotina, antes do procedimento de transfusão sanguínea. O médico hematologista, responsável pelo tratamento, conscientizava os pacientes ou seus responsáveis e os convidava a participar da pesquisa, mediante assinatura do TCLE, através do qual disponibilizavam a amostra de sangue para a realização dos testes. Foram coletados 10 ml de sangue venoso, em anticoagulante EDTAK₂, juntamente com a coleta das amostras para os exames pré-transfusionais.

Para os grupos de pacientes em tratamento com quelantes de ferro, foram obtidas 19 amostras. Deste total, no grupo DFO/L1 foram incluídos 14 pacientes, que estavam em tratamento com DFO, em doses de 0,5 a 5 g/dia, todos portadores de β -talassemia maior. Constatou-se que todos esses pacientes faziam uso também de L1, em esquema de terapia combinada. O grupo DFX constitui-se de 5 pacientes em tratamento com DFX, em doses de 250 a 500 mg/dia, sendo 4 portadores de β -talassemia maior e 1 de anemia falciforme.

Coletaram-se ainda amostras de pacientes sem nenhum tratamento quelante, sendo 2 portadores de β -talassemia intermédia e 10 portadores de anemia falciforme.

4.2.2 Isolamento dos Eritrócitos

Das amostras de sangue venoso, foram separadas alíquotas de 200 µl para determinação da atividade da G6-PD. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 10 min (centrífuga CELM), retirando-se o plasma e a camada de leucócitos.

As amostras do grupo controle foram lavadas três vezes com tampão fosfato salina (PBS) constituído de NaCl 137mmoles/l; KH_2PO_4 1,47mmoles/l; Na_2HPO_4 8,17mmoles/l e KCl 2,70 mmoles/l em pH 7,4. Em seguida, os eritrócitos foram ressuspensos no mesmo tampão, preparando-se suspensões com volume globular de 10 e 40%. Estas suspensões foram incubadas com soluções de DFO e DFX e, posteriormente, com agentes oxidantes, como descrito a seguir.

O mesmo tratamento foi dispensado às amostras dos pacientes, excluindo-se a fase de lavagem dos eritrócitos com PBS, com a finalidade de manter a presença dos medicamentos em estudo; e a fase de incubação com soluções de DFO e DFX, pois os pacientes já utilizavam tais medicamentos. Foram preparadas suspensões com volume globular de 10 e 40%, com posterior incubação com agentes oxidantes, como descrito a seguir.

4.2.3 Tratamento das Amostras do Grupo Controle com Quelantes de Ferro

As amostras do grupo controle foram tratadas com soluções dos quelantes de ferro em estudo, cujas concentrações foram calculadas para estarem próximas à média das concentrações utilizadas no tratamento dos pacientes, ou seja, soluções de DFO 1 e 2 mmoles/l ou DFX 1 e 2 mmoles/l, dissolvidos em PBS, segundo a técnica descrita por Santos (2008). As suspensões de eritrócitos preparadas foram fracionadas em alíquotas e adicionou-se DFO ou DFX. A homogeneização foi realizada por rotação (homogeneizador PHOENIX HS22) durante 60 min à temperatura ambiente.

4.2.4 Tratamento das Amostras com Substâncias Oxidantes

As suspensões de eritrócitos das amostras dos pacientes e do grupo controle, estas últimas após a incubação com as suspensões dos quelantes de ferro, foram incubadas com os agentes oxidantes *tert*-butilhidroperóxido (tBHP) ou dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (AAPH).

4.2.4.1 Incubação dos eritrócitos com tBHP

O tBHP foi dissolvido em PBS e adicionado às alíquotas de suspensões de eritrócitos. Para a técnica de determinação da concentração de metemoglobina foram utilizadas concentrações finais de 1, 3 e 5 mmoles/l adicionadas a 400 µl da suspensão a 10%, incubando-se durante 60 min à temperatura ambiente, sob constante homogeneização (homogeneizador PHOENIX HS22).

Para a técnica de determinação da concentração de GSH foram utilizadas concentrações finais de 1, 3 e 5 mmoles/l, adicionadas a 200 µl da suspensão a 40%, incubando-se durante 60 min à temperatura ambiente sob constante homogeneização (homogeneizador PHOENIX HS22).

Para a técnica de determinação das TBARS foram utilizadas concentrações finais de 1, 2 e 3 mmoles/l, adicionadas a 600 µl da suspensão a 10%, incubando-se durante 15 min à temperatura ambiente sob constante homogeneização (homogeneizador PHOENIX HS22).

Para a técnica de determinação da atividade enzimática da G6-PD foram utilizadas concentrações finais de 3 e 5 mmoles/l adicionadas às alíquotas de 200 µl de sangue total, incubando-se durante 60 min à temperatura ambiente sob constante homogeneização (homogeneizador PHOENIX HS22).

4.2.4.2 Incubação dos eritrócitos com AAPH

Para a determinação das porcentagens de hemólise foi utilizado o agente oxidante AAPH, dissolvido em PBS para concentrações finais de 50, 75 e 100 mmoles/l adicionados a 200 µl da suspensão de eritrócitos a 10%. A incubação ocorreu por 180 min à temperatura de 37°C (estufa FANEM 002CB).

4.2.5 Determinação da Concentração de Metemoglobina

A determinação da concentração de metemoglobina foi realizada segundo o método de Naoum *et al.* (2004).

Para cada determinação, em um tubo A foram adicionados 100 µl das suspensões de eritrócitos 10% a 100 µl de solução de saponina 1%. Homogeneizou-se para que ocorresse hemólise e adicionou-se 1000 µl de tampão fosfato 60 mmoles/l, preparado a partir da diluição de uma solução estoque de tampão fosfato 15 mmoles/l, constituído de Na₂HPO₄ 25 mmoles/l e KH₂PO₄ 42 mmoles/l. Procedeu-se à leitura da absorbância (A1) em comprimento de onda de 630nm (espectrofotômetro UV CINTRA 10), utilizando-se o tampão fosfato 60 mmoles/l como branco. Em um tubo B foram adicionados 100 µl da solução do tubo A a 1000µl do tampão fosfato 60 mmoles/l, realizando-se a leitura da absorbância (A2) em comprimento de onda de 540nm, utilizando-se o tampão fosfato 60 mmoles/l como branco. As dosagens foram realizadas em duplicata.

4.2.5.1 Cálculo da concentração de metemoglobina

Expressa-se a concentração de metemoglobina como uma porcentagem em relação à concentração total de hemoglobina, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ MetaHb} = \frac{A1 \times 100}{A1 + (A2 \times 10)}$$

Onde:

A1 - absorbância a 630nm

A2 - absorbância a 540nm

O coeficiente 10 se deve à diluição realizada no tubo B (100µl do tubo A para 1000µl do tampão fosfato), para obter sensibilidade técnica na leitura espectrofotométrica da oxihemoglobina em 540 nm (NAOUM *et al.*, 2004).

4.2.5.2 Princípio da técnica

A técnica proposta para a dosagem da concentração da metemoglobina, em valores percentuais, se fundamenta na avaliação da solução de hemoglobina, previamente estabilizada em tampão fosfato 60 mmoles/l, em dois comprimentos de onda específicos, para metemoglobina (630 nm) e para oxihemoglobina (540 nm) (NAOUM *et al.*, 2004).

4.2.6 Dosagem da Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

Foi utilizado o método baseado na determinação de glutathiona plasmática de Beutler *et al.* (1963), segundo a descrição de Claro *et al.* (2006).

Foram adicionados 50µl das suspensões de eritrócitos a 40% a 500 µl de água deionizada, produzindo um hemolisado. Foram adicionados então 750 µl de solução precipitante, composta de ácido metafosfórico glacial 20 mmoles/l, EDTA dissódico 0,5 mmol/l e NaCl 500 mmoles/l. A solução foi centrifugada por 10 min a 8.000 x g (centrífuga EPPENDORFF) e 500 µl do sobrenadante límpido foram adicionados a 2000 µl de solução recém preparada de Na₂HPO₄ 300 mmoles/l. A leitura espectrofotométrica da absorbância (A1) foi realizada a 412 nm (espectrofotômetro UV CINTRA 10). Depois desta determinação, foram adicionados à mesma solução, 250 µl de ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,02 g/dl, que desenvolve rapidamente uma coloração amarelada, realizando-se imediatamente nova leitura da absorbância (A2) a 412 nm. As dosagens foram realizadas em duplicata.

4.2.6.1 Cálculo da concentração de GSH

Expressa-se a concentração de GSH em $\mu\text{moles/g}$ de hemoglobina de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{GSH} = \frac{(A2 - A1) \times 101}{[\text{HB}]}$$

Onde:

A1 e A2 – absorbâncias a 412 nm

[HB] - concentração de hemoglobina do hemolisado em g/l

4.2.6.2 Princípio da técnica

Praticamente todos os compostos não protéicos sulfidrílicos dos eritrócitos estão na forma de GSH. O DTNB é um composto dissulfeto, prontamente reduzido por compostos sulfidrílicos, formando um ânion colorido, amarelo. A redução do DTNB, representada pela densidade óptica da substância amarela, é verificada espectrofotometricamente a 412 nm, comprimento de onda relativo à absorção do produto reduzido, o ácido 5-mercapto-2-nitrobenzóico (TNB) (Figura 17), ou sais correspondentes (BEUTLER *et al.*, 1963; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

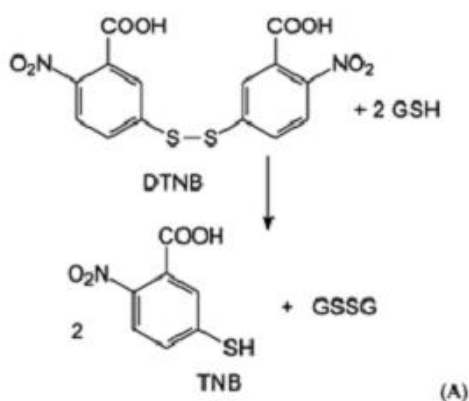


FIGURA 17 – REAÇÃO PARA DETECÇÃO DA GLUTATIONA.
(A) Reação enzimática do DTNB e do produto de sua redução, TNB, sob ação de GSH, observado em λ 412 nm
FONTE: VASCONCELOS *et al.* (2007)

4.2.7 Dosagem das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação das TBARS foi realizada segundo método de Cesquini, (2003).

Foram preparadas alíquotas de 600 µl da suspensão de eritrócitos a 10%, às quais foram adicionados 250 µl de ácido tricloroacético a 25 g/dl, centrifugando-se por 1 min a 3000 x g. Em seguida, foram retirados 500 µl do sobrenadante, com posterior adição de 500 µl de ácido tiobarbitúrico a 1 g/dl em NaOH 50 mmoles/l. A reação foi aquecida a 100°C (estufa ODONTOBRÁS) durante 15 min e, em seguida, resfriada em banho de gelo por mais 15 min. A absorbância foi lida em 532 nm (espectrofotômetro UV CINTRA 10). Em seguida, foi feita a mesma leitura em 600 nm, para descontar interferentes (CASTRO, 2003). As dosagens foram realizadas em duplicata.

4.2.7.1 Cálculo da concentração das TBARS

A concentração das TBARS é expressa em nmoles/g de hemoglobina, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{TBARS} = \frac{\Delta A}{1,56 \times 10^5 \times [\text{Hb}]}$$

Onde:

ΔA – Diferença dos valores de A em 532 e 600 nm
 $1,56 \times 10^5 \times l$ / mmoles / cm - coeficiente de extinção molar
[Hb] - concentração de hemoglobina da suspensão em g/l

4.2.7.2 Princípio da técnica

O malondialdeído (MDA) é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da β -ruptura de endociclicização de ácidos graxos poliinsaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosaexanóico.

Atualmente, o MDA pode ser usado como biomarcador geral de dano oxidativo, pois reage com o ácido tiobarbitúrico e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em 532 nm, contra um branco apropriado. As concentrações de MDA das amostras são calculadas utilizando-se um coeficiente de extinção (ϵ) de $1,56 \times 10^5 \times \text{l/mmoles/cm}$ (Figura 18) (CHAUDHURI *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

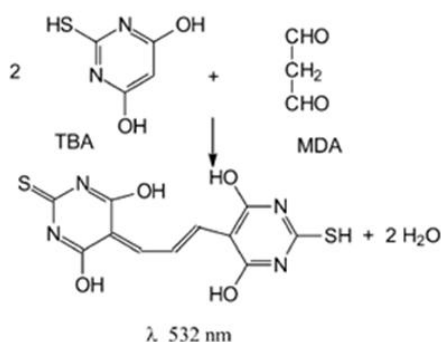


FIGURA 18 – REAÇÃO UTILIZADA PARA DETECÇÃO DE MDA EM PLASMA HUMANO. O ácido tiobarbitúrico reage com o MDA e forma um cromógeno que absorve em λ 532 nm
 FONTE: VASCONCELOS *et al.* (2007)

4.2.8 Determinação da Atividade Enzimática da Glicose 6-fosfato Desidrogenase (G6-PD)

A determinação da atividade enzimática da G6-PD foi realizada através de dosagem automatizada, em equipamento Cobas Mira (ROCHE), utilizando-se kit comercial (RANDOX). Foram lavados 200 μl de sangue total com 2000 μl de PBS, centrifugando-se a 3000 x g durante 10 min, repetindo-se o procedimento por três vezes. Os eritrócitos lavados foram ressuspensos em 500 μl de solução R4 (digitonina 0,2 g/l) e deixados por 15 min à temperatura de 4°C. O hemolisado resultante foi centrifugado novamente a 3000 x g por 10 min. O sobrenadante foi utilizado para dosagem no equipamento, que utiliza 15 μl do hemolisado e adiciona 1000 μl da solução R1 (EDTA 3,2 mmoles/l e trietanolamina 31,7 mmoles/l, pH 7,6) e 30 μl da solução R2 (NADP 0,34 mmoles/l). Depois de misturada, a solução foi incubada por 5 min a 37°C e foram adicionados 15 μl da solução R3 (substrato glicose 6-fosfato 0,58 mmoles/l). A leitura foi realizada pelo equipamento em 340 nm. As dosagens foram realizadas em duplicata.

4.2.8.1 Cálculo da atividade enzimática da G6-PD

O equipamento libera o resultado em mUI de eritrócitos/ml de sangue. Para conversão em UI/g Hb, o valor liberado pelo equipamento foi dividido pelo valor da hemoglobina da amostra (g/dl).

4.2.8.2 Princípio da técnica

Os eritrócitos dependem principalmente da glicose anaeróbica para suas necessidades energéticas. Um dos principais caminhos é a monofosfato hexase, enzima chave para a G6-PD. A G6-PD catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato (G6P) a 6-fosfogluconolactona que, rapidamente, se hidrolisa espontaneamente a 6-fosfogluconato (6PG), com a redução simultânea de NADP a NADPH. Na conversão, o NADPH está envolvido na manutenção da integridade da membrana do eritrócito. A atividade da enzima é determinada pela taxa de variação da absorbância, em 340 nm, associada à redução do NADP⁺ (KORN BERG *et al.*, 1955; LOHR *et al.*, 1974; MAKAREM, 1974; ROPER *et al.*, 2006).



Na segunda e consecutiva reação oxidante, onde a G6P é convertida em 6-fosfogluconolactona, com redução de mais uma molécula de NADP a NADPH, a lactona sofre descarboxilação para ribulose 5-fosfato, através de uma reação catalisada por uma lactonase específica, mas que também pode ocorrer espontaneamente. Assim, a reação completa, catalisada pela G6-PD pode ser assim escrita:



A liberação de CO₂ força a reação para a direita, de modo que a via, na prática, não é reversível (ROPER *et al.*, 2006). Os ensaios mais comumente

utilizados para determinação da atividade da G6-PD medem a taxa de redução do NADP a NADPH quando um hemolisado é incubado com G6P (BEUTLER *et al.*, 1963).

4.2.9 Determinação das Porcentagens de Hemólise

A determinação das porcentagens de hemólise foi realizada segundo método de Banerjee *et al.* (2008), adaptado.

Foram preparadas alíquotas de 200 µl da suspensão de eritrócitos a 10%, as quais foram incubadas com 200 µl das soluções de AAPH a 100, 150 e 200 mmoles/l, resultando nas concentrações finais de 50, 75 e 100 mmoles/l, durante 3 h à temperatura de 37°C (estufa FANEM 002CB). Alíquotas de 200 µl da mesma suspensão foram incubadas com 200 µl de PBS, para determinação da porcentagem de hemólise basal; e com 200 µl de água deionizada, para determinação da porcentagem de hemólise total.

Após a incubação, as alíquotas foram centrifugadas a 3000 x g por 10 min. A porcentagem de hemólise foi determinada por espectrofotometria, medindo-se a absorbância do sobrenadante em 540 nm (leitora de microplacas THERMO PLATE).

4.2.9.1 Cálculo das porcentagens de hemólise

A hemólise relativa foi calculada proporcionalmente à hemólise nas amostras preparadas com água deionizada, que foram consideradas como 100% (CHAUDHURI *et al.*, 2007; BANERJEE *et al.*, 2008).

4.2.9.2 Princípio da técnica

O AAPH induz hemólise através da geração de radicais aquosos peroxil, por decomposição térmica aeróbica e a extensão da hemólise é diretamente

proporcional à quantidade dos radicais formados (NIKI *et al.* 1988; KONDO *et al.*, 1997).

4.2.10 Análise Estatística dos Resultados

Os dados resultantes dos experimentos foram submetidos à análise estatística de variância ANOVA, inteiramente causalizada e fatorial, seguida do teste de Tukey para comparação de pares de médias. Foi considerada significância estatística para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos no estudo da ação de DFO e DFX no metabolismo oxidativo de eritrócitos estão apresentados a seguir.

A Figura 19 apresenta os dados de caracterização dos grupos. O grupo controle constitui-se de 9 indivíduos do sexo feminino e 1 do sexo masculino com idade de 20 a 41; o grupo DFO/L1 de 10 pacientes do sexo feminino e 4 do sexo masculino com idade entre 7 e 28 anos; e o grupo DFX de 2 pacientes do sexo feminino e 3 do sexo masculino com idade de 18 a 33 anos.

Coletaram-se ainda amostras de pacientes sem nenhum tratamento quelante, sendo 2 portadores de talassemia intermédia, do sexo feminino com idades de 6 e 13 anos e 10 portadores de anemia falciforme, sendo 6 do sexo masculino e 4 do sexo feminino com idades entre 12 e 29 anos.

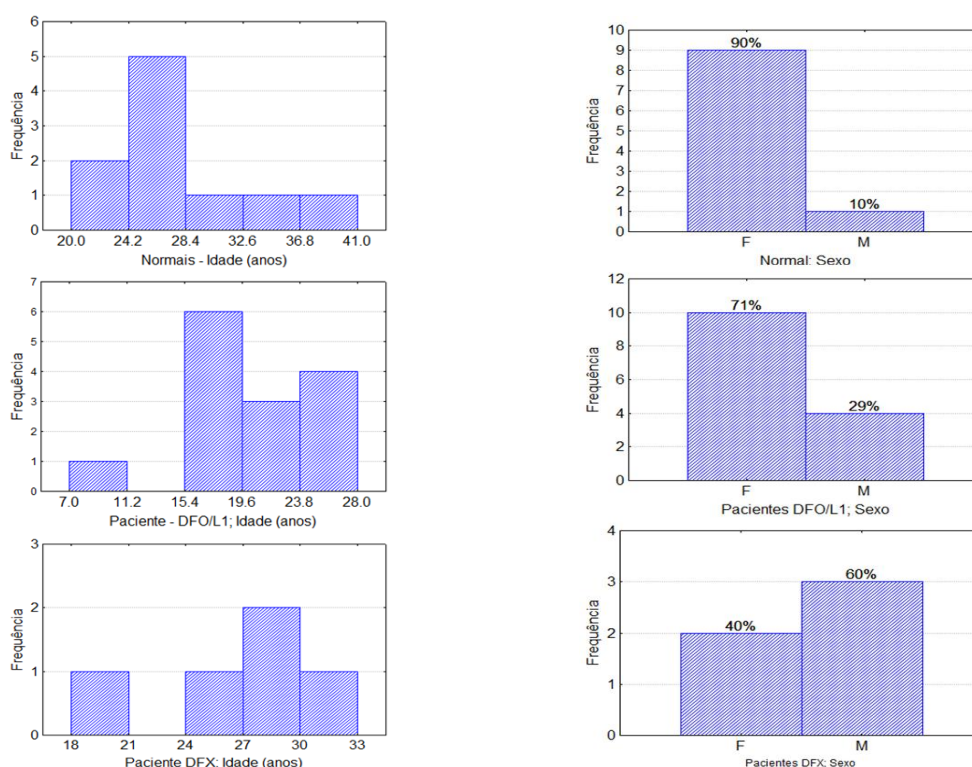


FIGURA 19 – FREQUÊNCIAS DE SEXO E IDADE PARA OS GRUPOS CONTROLE E PACIENTES TRATADOS COM DFO/L1 E DFX

NOTA: DFO/L1 – desferoxamina/deferiprona; DFX - deferasirox

A Figura 20 apresenta as concentrações de hemoglobina para os grupos controle e de pacientes tratados com DFO/L1 e DFX, que variaram de 13,4 a 14,7 g/dl no grupo controle, de 8,5 a 11,1 g/dl no grupo DFO/L1 e de 6,5 a 10,7 g/dl no grupo DFX. O tempo decorrido da última transfusão sanguínea recebida pelos pacientes até a data da coleta variou de 17 a 90 dias no grupo DFO/L1; e de 30 a 100 dias no grupo DFX.

Nos pacientes sem tratamento quelante as concentrações de hemoglobina foram de 10,9 e 13,1 g/dl nos portadores de talassemia intermédia e variaram de 8,3 a 11,1 g/dl nos portadores de anemia falciforme.

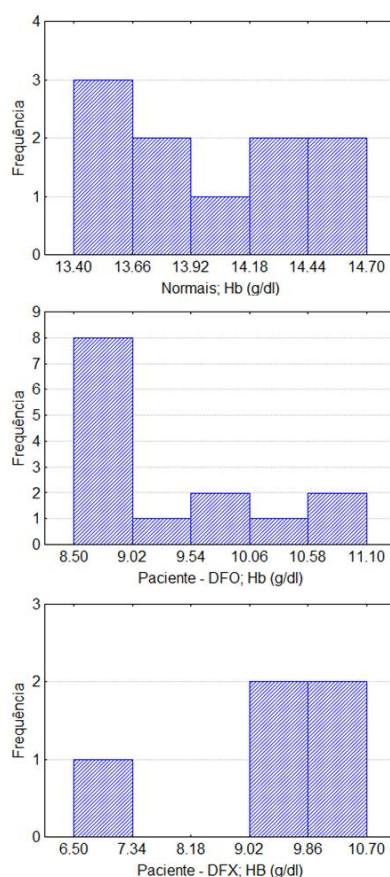


FIGURA 20 – VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA PARA O GRUPO CONTROLE E DE PACIENTES TRATADOS COM DFO/L1 E DFX

NOTA: DFO/L1 – desferoxamina/deferiprona; DFX - deferasirox

5.1 DOSAGEM DE METEMOGLOBINA

Nas Figuras 21 a 26 estão apresentados os resultados obtidos para as dosagens de metemoglobina. A Figura 21 mostra a formação de metemoglobina (%) nos eritrócitos normais submetidos à ação de 1, 3 e 5 mmoles/l do oxidante *t*BHP.

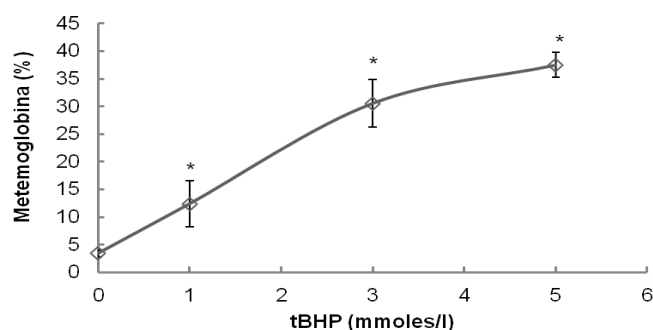


FIGURA 21 – FORMAÇÃO DE METEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *t*BHP.

NOTAS: 0 - valor de metemoglobina basal; *t*BHP – *tert*-butilhidroperóxido; n = 20, a partir de 10 amostras em duplicata; * - diferença estatisticamente significativa em relação ao basal (Tukey, $p < 0,05$); As barras de erro representam o desvio padrão;

A Figura 22 mostra a formação de metemoglobina (%) nos eritrócitos normais, previamente tratados com soluções de DFO nas concentrações de 1 e 2 mmoles/l e, posteriormente, submetidos à ação de 5 mmoles/l de *t*BHP. A incubação somente com o DFO foi utilizada como controle, obtendo-se valores de metemoglobina próximos aos basais.

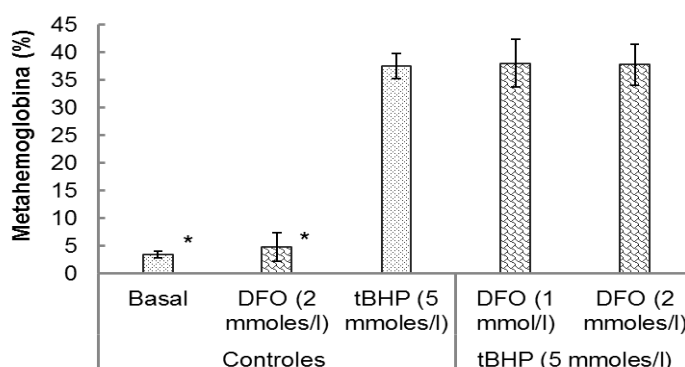


FIGURA 22– FORMAÇÃO DE METEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFO E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 5 mmoles/l DE *t*BHP.

NOTAS: Controles – valor de metemoglobina basal, amostra tratada apenas com 2 mmoles/l de DFO e apenas com 5 mmoles/l *t*BHP; *t*BHP – *tert*-butilhidroperóxido; DFO – desferoxamina; n = 20, a partir de 10 amostras em duplicata.

* - diferenças estatisticamente significantes em relação ao basal (Tukey, $p < 0,05$)

As barras de erro representam o desvio padrão.

Resultados

A Figura 23 mostra a formação de metemoglobina (%) nos eritrócitos normais tratados com soluções de DFX nas concentrações de 1 e 2 mmoles/l e submetidos à ação de 5 mmoles/l de *t*BHP. A incubação somente com o DFX foi utilizada como controle, verificando-se aumento da formação de metemoglobina, em relação à amostra sem tratamento, com médias de 9,48 e 3,42%, respectivamente.

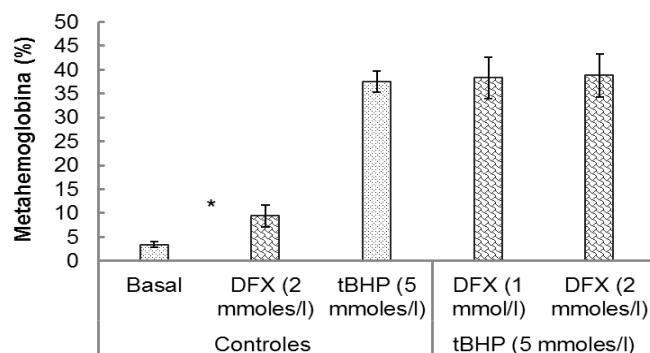


FIGURA 23 – FORMAÇÃO DE METEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 5 mmoles/l DE *t*BHP.

NOTAS: Controles – valor de metemoglobina basal, amostra tratada apenas com 2 mmoles/l de DFX e apenas com 5 mmoles/l *t*BHP; *t*BHP – *terc*-butilhidroperóxido; DFX - deferassirox n = 20, a partir de 10 amostras em duplicata.

* - diferenças estatisticamente significantes em relação ao basal (Tukey, p<0,05)

As barras de erro representam o desvio padrão

A Figura 24 mostra a formação de metemoglobina (%) nos eritrócitos de pacientes em tratamento com DFO/L1 e com DFX submetidos à ação de 1, 3 e 5 mmoles/l do *t*BHP, em comparação aos eritrócitos normais. As diferenças são estatisticamente significantes entre os valores basais e as concentrações de 3 e 5 mmoles/l (teste Tukey, $p > 0.05$). Pode-se observar menores níveis de metemoglobina nos eritrócitos dos pacientes com 1mmol/l do *t*BHP. A análise estatística destes dados, ANOVA com um critério, indica diferença estatisticamente significativa para eritrócitos dos pacientes DFO/L1 em relação aos normais (Figura 25).

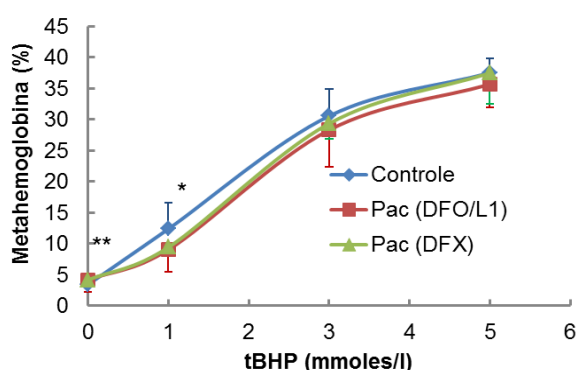


FIGURA 24 – FORMAÇÃO DE METEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *t*BHP.

NOTAS: 0 - valor de metemoglobina basal; *t*BHP – *tert*-butilhidroperóxido; DFO/L1 – desferoxamina/deferiprona; DFX – deferasirox; ** - Diferença estatisticamente significativa com o basal (sem *t*BHP) (Tukey, $p < 0,05$); * - Diferença estatisticamente significativa com o controle a 1 mmoles/l *t*BHP (Tukey, $p < 0,05$); Tamanho amostral: Controle - $n = 20$, a partir de 10 amostras em duplicata; DFO/L1 - $n = 28$, a partir de 14 amostras em duplicata; DFX - $n = 10$, a partir de 5 amostras em duplicata; As barras de erro representam o desvio padrão.

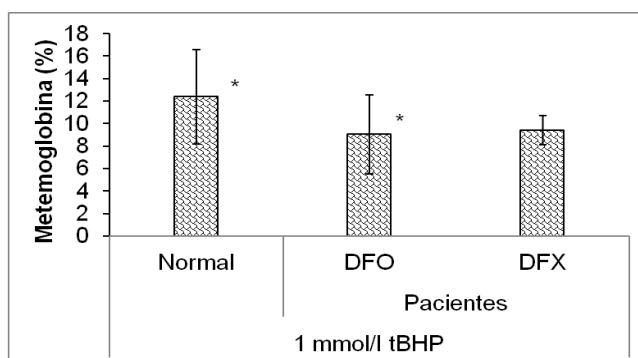


FIGURA 25 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE METEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE 1 mmol/l DE *t*BHP.

NOTAS: *t*BHP – *tert*-butilhidroperóxido; DFO - eritrócitos de pacientes em tratamento com DFO/L1; DFX - eritrócitos de pacientes em tratamento com DFX; Tamanho amostral: Controle - $n = 20$, a partir de 10 amostras em duplicata; DFO/L1 - $n = 28$, a partir de 14 amostras em duplicata; DFX - $n = 10$, a partir de 5 amostras em duplicata; * - diferença estatisticamente significativa com o controle (Tukey, $p = 0,011$); As barras de erro representam o desvio padrão.

Resultados

Para efeito de comparação, foram realizados ensaios em eritrócitos isolados de pacientes portadores de β -talassemia intermédia ou de anemia falciforme, sem tratamento quelante, frente ao agente oxidante. Com relação às concentrações de metemoglobina (Figura 26), há aumento com o aumento da concentração de tBHP, com diferenças estatisticamente significantes. Entretanto, os eritrócitos desses pacientes apresentaram menores índices de metemoglobina que os de indivíduos normais frente à baixa concentração do agente pró-oxidante tBHP (1mmol/l) (ANOVA, $p < 0,05$).

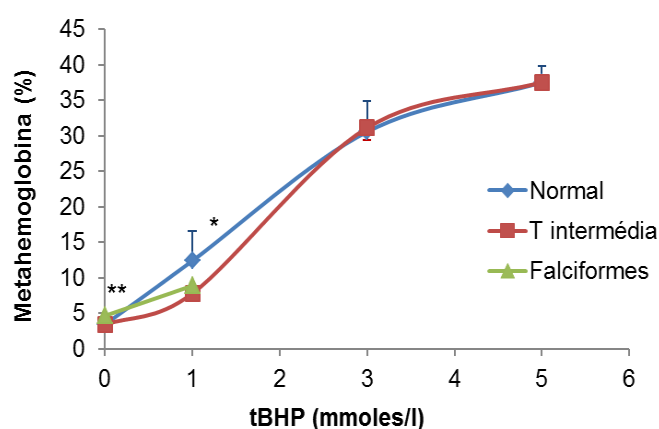


FIGURA 26 – FORMAÇÃO DE METEMOGLOBINA EM ERITRÓCITOS NORMAIS E DE PACIENTES PORTADORES DE TALASSEMIA INTERMÉDIA OU ANEMIA FALCIFORME, SEM TRATAMENTO QUELANTE, SUBMETIDOS À AÇÃO DE tBHP.

NOTAS: 0 - valor de metemoglobina basal; tBHP – *tert*-butilhidroperóxido
 ** - Diferença estatisticamente significativa com o basal (sem tBHP) (Tukey, $p < 0,05$)
 * - Diferença estatisticamente significativa com a 1 mmol/l tBHP (Tukey, $p < 0,05$)
 Tamanho amostral: normal = 20; talassemia intermédia = 4; falciformes = 10
 A barra de erro representa o desvio padrão

5.2 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DE GSH

Nas Figuras 27 a 32 são apresentados os resultados obtidos para as concentrações de GSH. A Figura 27 mostra as concentrações de GSH ($\mu\text{moles/gHb}$) nos eritrócitos normais submetidos à ação de 1, 3 e 5 mmoles/l do *t*BHP, sob homogeneização, durante 1 hora à temperatura ambiente.

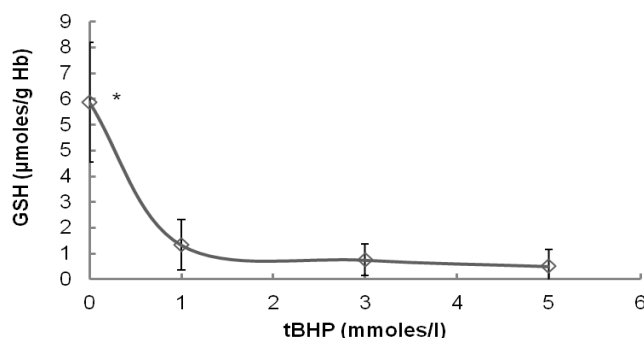


FIGURA 27 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE *t*BHP.

NOTAS: 0 - valor de GSH basal; *t*BHP – *tert*-butilhidroperóxido; n = 20, a partir de 10 amostras em duplicata; * - diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$)
As barras de erro representam o desvio padrão.

A Figura 28 mostra a concentração de GSH ($\mu\text{moles/gHb}$) nos eritrócitos normais, tratados com soluções de DFO nas concentrações de 1 e 2 mmoles/l e submetidos à ação de 5 mmoles/l de *t*BHP. A incubação somente com o DFO foi utilizada como controle, obtendo-se valor de GSH próximo do basal.

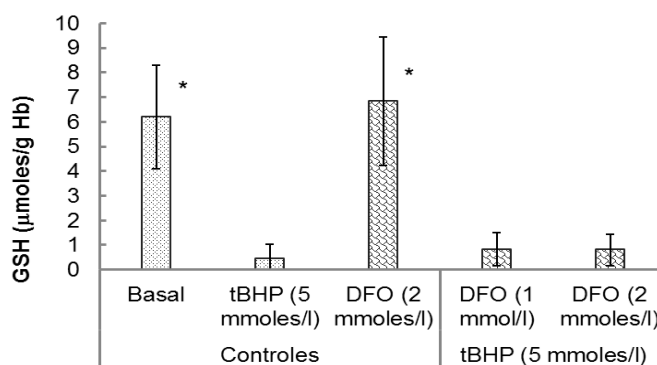


FIGURA 28 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFO E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 5 mmoles/l DE *t*BHP.

NOTAS: Controles – valor de GSH basal, amostra tratada apenas com 2 mmoles/l de DFO e apenas com 5 mmoles/l *t*BHP; *t*BHP – *tert*-butilhidroperóxido; DFO - desferoxamina; n = 20, a partir de 10 amostras em duplicata. * - diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$);
As barras de erro representam o desvio padrão.

Resultados

A Figura 29 mostra a concentração de GSH ($\mu\text{moles/gHb}$) nos eritrócitos normais tratados com soluções de DFX nas concentrações de 1 e 2 mmoles/l e submetidos à ação de 5 mmoles/l de *t*BHP. A incubação somente com o DFX foi utilizada como controle, não sendo observada diferença em relação ao valor basal.

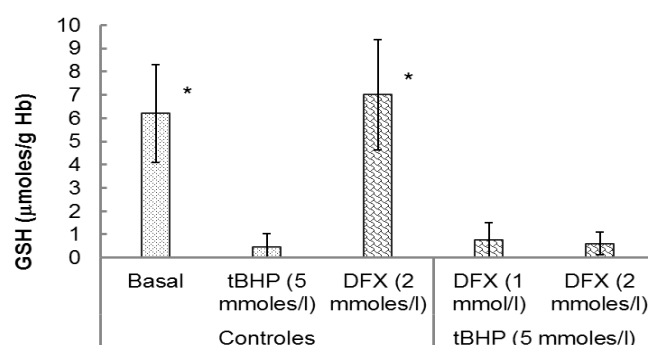


FIGURA 29 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 5 mmoles/l DE *t*BHP

NOTAS: Controles – valor de GSH basal, amostra tratada apenas com 2 mmoles/l de DFO e apenas com 5 mmoles/l *t*BHP; *t*BHP – *tert*-butilhidroperóxido; DFX - deferassirox
 $n = 20$, a partir de 10 amostras em duplicata; * - diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$); As barras de erro representam o desvio padrão.

A Figura 30 mostra a concentração de GSH ($\mu\text{moles/gHb}$) nos pacientes em tratamento com DFO/L1 e com DFX submetidos à ação de 1, 3 e 5 mmoles/l do *t*BHP, em comparação ao grupo controle. Observa-se menor redução na concentração de GSH nos grupos em tratamento com os quelantes de ferro.

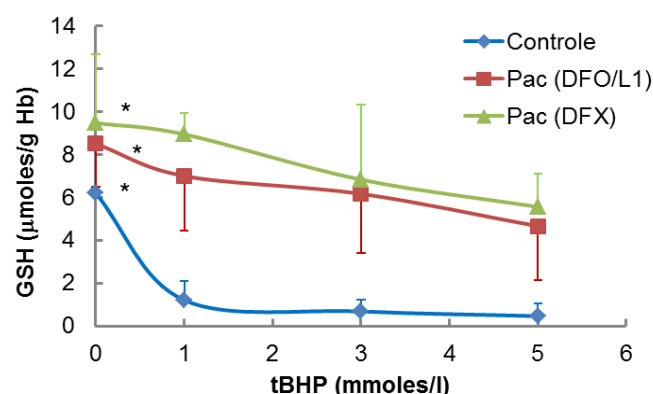


FIGURA 30 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO/L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO DE *t*BHP.

NOTAS: 0 - valor de GSH basal; *t*BHP – *tert*-butilhidroperóxido; DFO/L1 – desferoxamina/deferiprona; DFX – deferassirox; * - diferença estatisticamente significativa com os basais (sem *t*BHP) (Tukey, $p < 0,05$); Todos os tratamentos foram diferentes do controle em todas as concentrações de *t*BHP; Tamanho amostral: Controle - $n = 20$, a partir de 10 amostras em duplicata; DFO/L1 - $n = 28$, a partir de 14 amostras em duplicata; DFX - $n = 10$, a partir de 5 amostras em duplicata; As barras de erro representam o desvio padrão.

Resultados

A análise estatística dos dados anteriores mostra maiores níveis de GSH nos eritrócitos dos pacientes em relação aos normais, para todas as concentrações de tBHP utilizadas (Tukey, $<0,05$) (Figura 31).

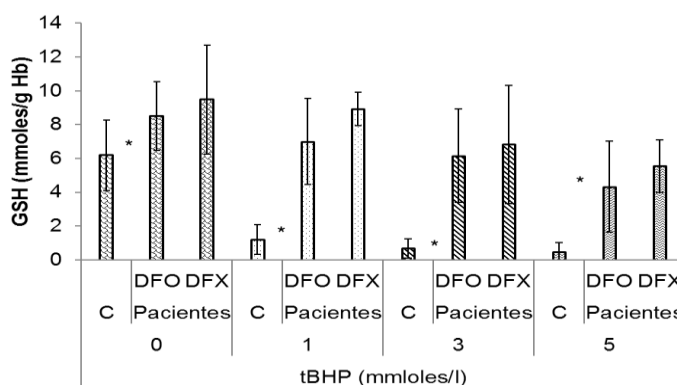


FIGURA 31 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO/L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP

NOTAS: 0 - valor de GSH basal; tBHP – *tert*-butilhidroperóxido; DFO/L1 – desferoxamina/deferiprona; DFX – deferasirox; * - diferença estatisticamente significativa em relação aos controles (Tukey, $p<0,05$); C - eritrócitos normais; DFO = eritrócitos de pacientes em tratamento com DFO/L1; Tamanho amostral: Controle - $n = 20$, a partir de 10 amostras em duplicata; DFO/L1 - $n = 28$, a partir de 14 amostras em duplicata; DFX - $n = 10$, a partir de 5 amostras em duplicata. As barras de erro representam o desvio padrão.

Nos ensaios realizados em eritrócitos isolados de portadores de β -talassemia intermédia ou de anemia falciforme, sem tratamento, há uma diminuição gradativa nas concentrações de GSH com aumento da concentração de tBHP, com diferenças estatisticamente significantes entre as médias (Figura 32). Entretanto, eritrócitos de pacientes com talassemia intermédia apresentam maiores concentrações de GSH que os normais, frente ao tBHP (ANOVA, $p<0,05$).

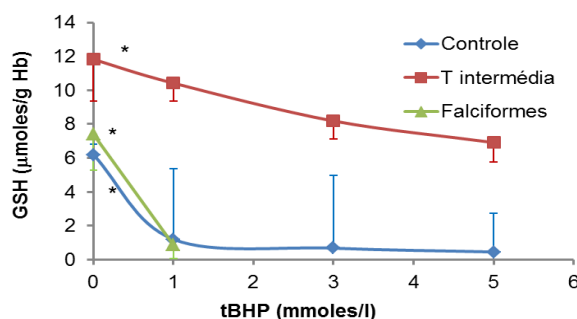


FIGURA 32 – CONCENTRAÇÃO DE GSH EM ERITRÓCITOS NORMAIS E DE PORTADORES DE TALASSEMIA INTERMÉDIA OU ANEMIA FALCIFORME, SEM TRATAMENTO QUELANTE, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP

NOTAS: 0 - valor de GSH basal; tBHP – *tert*-butilhidroperóxido; * = Diferença estatisticamente significativa com a média do controle (Tukey, $p<0,05$); Tamanho amostral: normal = 20; talassemia intermédia = 4; falciformes = 10; A barra de erro representa o desvio padrão

Resultados

5.3 DOSAGEM DA CONCENTRAÇÃO DAS TBARS

Nas Figuras 33 a 38 são apresentados os resultados obtidos para as concentrações das TBARS. A Figura 32 mostra a formação de TBARS (nmoles/gHb) nos eritrócitos normais submetidos à ação de 1, 2 e 3 mmoles/l do tBHP.

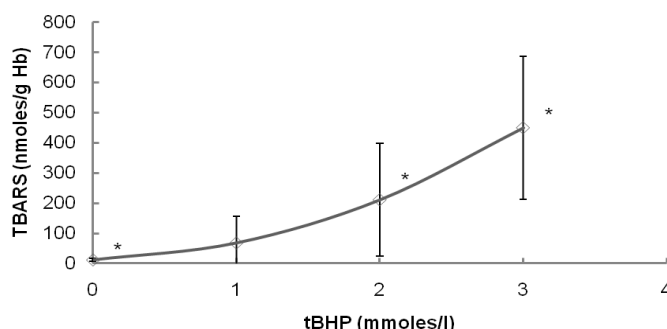


FIGURA 33 – FORMAÇÃO DE TBARS EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE tBHP.

NOTAS: 0 - valor de TBARS basal; tBHP – *tert*-butilhidroperóxido; n = 20, a partir de 10 amostras em duplicata; * - diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$); As barras de erro representam o desvio padrão.

A Figura 34 mostra a concentração de TBARS (nmoles/gHb) nos eritrócitos normais tratados com soluções de DFO nas concentrações de 1 e 2 mmoles/l e submetidos à ação de 3 mmoles/l de tBHP. A incubação somente com o DFO foi utilizada como controle e o valor de TBARS permaneceu próximo ao valor basal. Com a adição do oxidante, o aumento na formação de TBARS foi menor que no grupo controle, com diferença de quase 50% (280 contra 450 nmoles/gHb) sem diferenças estatísticas entre as duas concentrações do fármaco (1 e 2 mmoles/l).

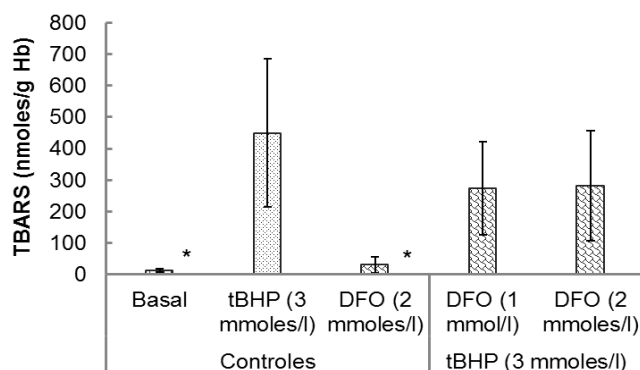


FIGURA 34 – CONCENTRAÇÃO DE TBARS EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFO E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 3 mmoles/l DE tBHP.

NOTAS: Controles - valor de TBARS basal, amostra tratada apenas com 2 mmoles/l de DFO e apenas com 5 mmoles/l tBHP; tBHP – *tert*-butilhidroperóxido; DFO - desferoxamina n = 20, a partir de 10 amostras em duplicata; * - diferença estatisticamente significativa (Tukey, $< 0,05$); As barras de erro representam o desvio padrão.

Resultados

A Figura 35 mostra a concentração de TBARS (nmoles/gHb) nos eritrócitos normais tratados com soluções de DFX nas concentrações de 1 e 2 mmoles/l e submetidos à ação de 3 mmoles/l de tBHP. A incubação somente com o DFX foi utilizada como controle e o valor de TBARS permaneceu próximo ao valor basal. Com a adição do oxidante, o aumento na formação de TBARS foi menor que no grupo controle, com diferença de menos de 50% (190 a 450 nmoles/g Hb), sem diferenças estatísticas entre as duas concentrações do fármaco (1 e 2 mmoles/l).

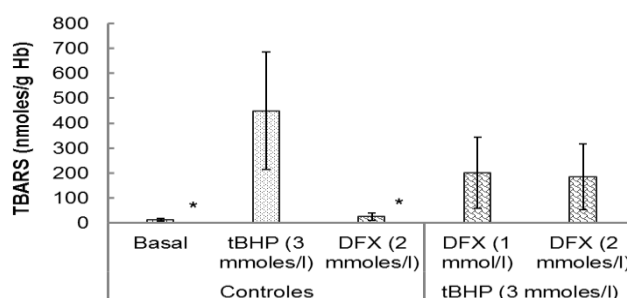


FIGURA 35 – CONCENTRAÇÃO DE TBARS EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 3 mmoles/l DE tBHP.

NOTAS: Controles - valor de TBARS basal, amostra tratada apenas com 2 mmoles/l de DFX e apenas com 5 mmoles/l tBHP; tBHP - *tert*-butilhidroperóxido; DFX - deferasirox n = 20, a partir de 10 amostras em duplicata; * - diferença estatisticamente significativa (Tukey, p<0,05); As barras de erro representam o desvio padrão.

A Figura 36 mostra a concentração de TBARS (nmoles/gHb) nos eritrócitos de pacientes em tratamento com DFO/L1 e com DFX submetidos à ação de 1, 2 e 3 mmoles/l de tBHP, em comparação aos eritrócitos normais. Há aumento nas TBARS diretamente proporcional à concentração do oxidante, mas com diferenças estatisticamente significantes nas concentrações de 2 e 3 mmoles/l, havendo uma resistência à baixa concentração, nos pacientes em relação ao controle.

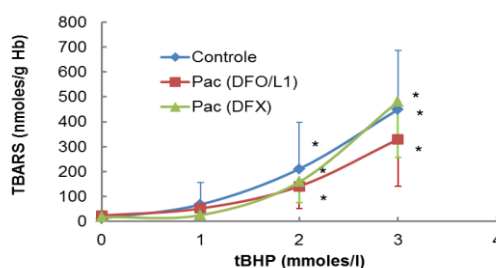


FIGURA 36– CONCENTRAÇÃO DE TBARS EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP.

NOTAS: 0 - valor de TBARS basal; tBHP – *tert*-butilhidroperóxido; DFO/L1 - desferoxamina/deferiprona; DFX - deferasirox; * - diferença estatisticamente significativa com os basais (sem tBHP) (Tukey, p<0,05); Tamanho amostral: Controle - n = 20, a partir de 10 amostras em duplicata; DFO/L1 - n = 28, a partir de 14 amostras em duplicata; DFX - n = 10, a partir de 5 amostras em duplicata; As barras de erro representam o desvio padrão

Resultados

A análise estatística dos dados anteriores (Figura 37) mostra que não há diferença entre os níveis de TBARS nos eritrócitos dos pacientes comparados aos normais para as mesmas concentrações de *t*BHP utilizadas (ANOVA, $p>0,05$).

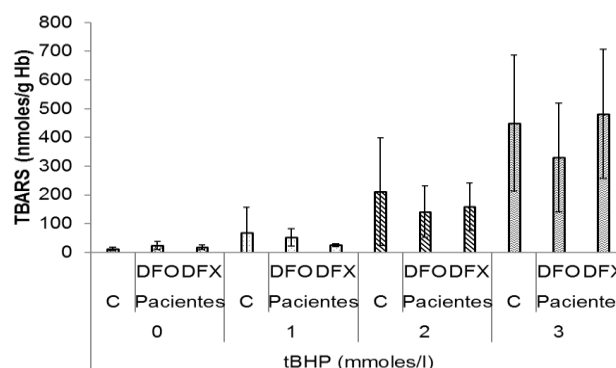


FIGURA 37 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE TBARS EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *t*BHP.

NOTAS: 0 - valor de TBARS basal; *t*BHP - *tert*-butilhidroperóxido; DFO/L1 – desferoxamina/deferiprona; DFX – deferasirox; Sem diferenças estatisticamente significantes em relação à média dos controles (ANOVA, $p > 0,05$) ; C - eritrócitos normais; DFO = eritrócitos de pacientes em tratamento com DFO/L1; Tamanho amostral: Controle - $n = 20$, a partir de 10 amostras em duplicata; DFO/L1 – $n = 28$, a partir de 14 amostras em duplicata; DFX - $n = 10$, a partir de 5 amostras em duplicata; As barras de erro representam o desvio padrão.

Nos ensaios realizados em eritrócitos de portadores de β -talassemia intermédia ou de anemia falciforme, sem tratamento, frente ao agente oxidante, há aumento gradativo nas concentrações de TBARS com aumento da concentração de *t*BHP, sem diferenças estatisticamente significantes entre as médias, comparados aos normais nas mesmas concentrações (ANOVA, $p>0,05$) (Figura 38).

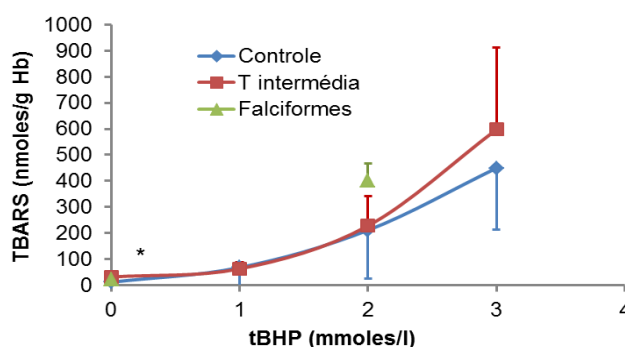


FIGURA 38 – CONCENTRAÇÃO DE TBARS EM ERITRÓCITOS NORMAIS E DE PORTADORES DE TALASSEMIA INTERMÉDIA E ANEMIA FALCIFORME, SEM TRATAMENTO QUELANTE, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *t*BHP.

NOTAS: 0 - valor de TBARS basal; *t*BHP - *tert*-butilhidroperóxido; * - Diferença estatisticamente significativa com os basais (sem *t*BHP) para as concentrações 2 e 3 mmol/L *t*BHP (Tukey, $p<0,05$); Sem diferença estatisticamente significativa dos pacientes com os indivíduos normais para as mesmas concentrações de *t*BHP (ANOVA, $p>0,05$); Tamanho amostral: normal = 20; talassemia intermédia = 4; falciformes = 10; A barra de erro representa o desvio padrão

Resultados

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA G6-PD

Nas Figuras 39 a 44 são apresentados os resultados obtidos para as concentrações de G6-PD. A Figura 39 mostra as atividades de G6-PD (UI/gHb) nos eritrócitos normais submetidos à ação de 3 e 5 mmoles/l do tBHP.

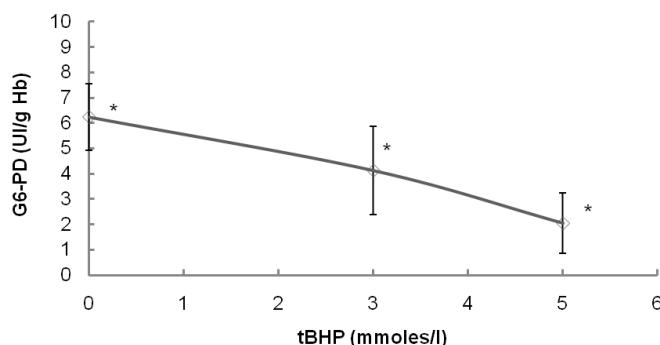


FIGURA 39 – ATIVIDADE DA ENZIMA G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS SUBMETIDOS À AÇÃO DE tBHP.
NOTAS: 0 - valor de G6-PD basal; tBHP - *tert*-butilhidroperóxido; n = 20, a partir de 10 amostras em duplicata; * - diferença estatisticamente significativa para (Tukey, p<0,05); As barras de erro representam o desvio padrão.

A Figura 40 mostra a atividade da G6-PD (UI/gHb) nos eritrócitos normais tratados com soluções de DFO nas concentrações de 1 e 2 mmoles/l e submetidos à ação de 5 mmoles/l do tBHP. A incubação somente com o DFO foi utilizada como controle e a atividade da enzima ficou próxima do basal. A atividade enzimática diminuiu com a adição do oxidante, sem diferenças estatisticamente significativas entre as duas concentrações do fármaco (1 e 2 mmoles/l).

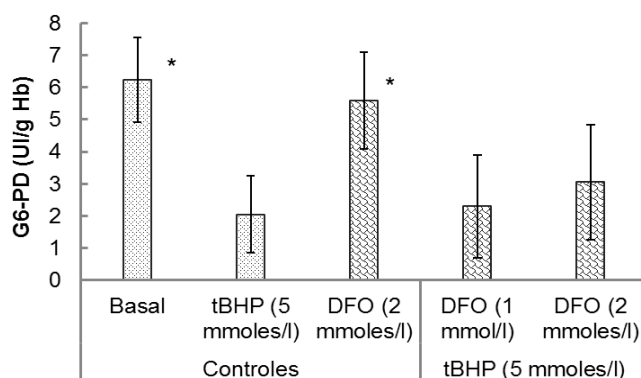


FIGURA 40 – ATIVIDADE DA ENZIMA G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFO E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 5 mmoles/l DE tBHP.

NOTAS: Controles - valor de G6-PD basal, amostra tratada apenas com 2 mmoles/l de DFO e apenas com 5 mmoles/l tBHP; tBHP - *tert*-butilhidroperóxido; DFO - desferoxamina; n = 20, a partir de 10 amostras em duplicata; * - diferença estatisticamente significativa (Tukey, p<0,05); As barras de erro representam o desvio padrão.

A Figura 41 mostra a atividade de G6-PD (UI/gHb) nos eritrócitos normais tratados com soluções de DFX nas concentrações de 1 e 2 mmol/l e submetidos à ação de 5 mmol/l de tBHP. A incubação somente com o DFX foi utilizada como controle e a atividade da enzima ficou próxima da basal. Observa-se que há um decréscimo na atividade da G6-PD com adição do oxidante, sem diferença estatisticamente significativa entre as concentrações do fármaco (1 e 2 mmol/l).

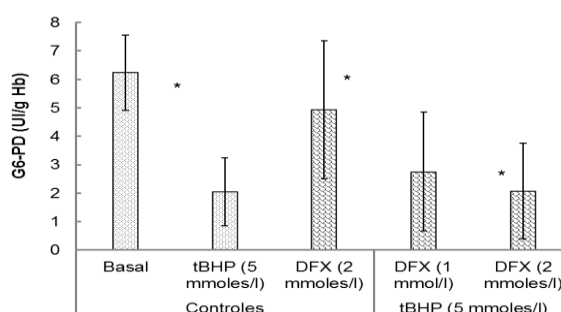


FIGURA 41 – ATIVIDADE DA ENZIMA G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 5 mmol/l DE tBHP.

NOTAS: Controles - valor de G6-PD basal, amostra tratada apenas com 2 mmol/l de DFO e apenas com 5 mmol/l tBHP; tBHP – *terc*-butilhidroperóxido; DFX – desferoxamina; n = 20, a partir de 10 amostras em duplicata; * - diferença estatisticamente significativa (Tukey, p<0,05); As barras de erro representam o desvio padrão.

A Figura 42 mostra a atividade da G6-PD (UI/gHb) nos eritrócitos dos pacientes em tratamento com DFO/L1 e com DFX submetidos à ação de 3 e 5 mmol/l do tBHP, em comparação aos eritrócitos normais. A atividade da enzima diminui com o aumento da concentração do oxidante, com diferenças estatisticamente significantes.

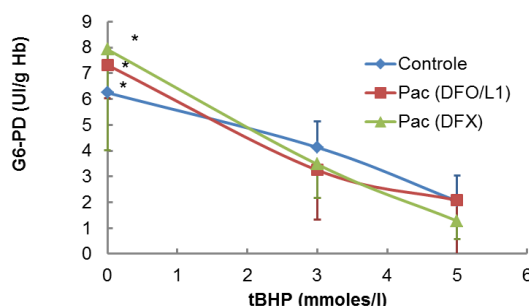


FIGURA 42 – CONCENTRAÇÃO DE G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE tBHP.

NOTAS: 0 - valor de G6-PD basal; tBHP – *terc*-butilhidroperóxido; DFO/L1 – desferoxamina/deferiprona; DFX – deferasirox; * - diferenças estatisticamente significantes em relação aos basais (sem tBHP) (Tukey, p<0,05); Tamanho amostral: Controle - n = 20, a partir de 10 amostras realizadas em duplicata; DFO/L1 - n = 28, a partir de 14 amostras realizadas em duplicata; DFX - n = 10, a partir de 5 amostras realizadas em duplicata; As barras de erro representam o desvio padrão

Resultados

Não foram observadas diferenças estatísticas entre as atividades da G6-PD em eritrócitos de pacientes tratados com quelantes comparados com os normais para as mesmas concentrações de *t*BHP utilizadas (ANOVA, $p>0,05$) (Figura 43).

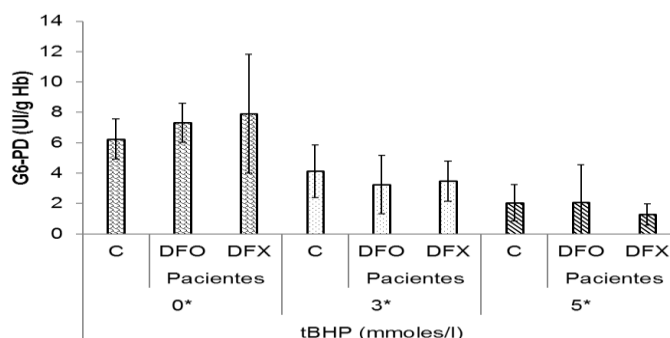


FIGURA 43 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *t*BHP.

NOTAS: 0 - valor de G6-PD basal; *t*BHP – *tert*-butilhidroperóxido; DFO/L1 – desferoxamina/deferiprona; DFX – deferasirox; Sem diferenças estatisticamente significantes em relação aos controles (C) (ANOVA, $p > 0,05$); Tamanho amostral: Controle - $n = 20$, a partir de 10 amostras em duplicata; DFO/L1 - $n = 28$, a partir de 14 amostras em duplicata; DFX - $n = 10$, a partir de 5 amostras em duplicata; As barras de erro representam o desvio padrão

Em eritrócitos isolados de pacientes portadores de β -talassemia intermédia ou de anemia falciforme sem tratamento, frente ao agente oxidante, houve diminuição gradativa da atividade da G6-PD com o aumento da concentração de *t*BHP, com diferenças estatisticamente significantes apenas para a concentração de 5 mmol/L. No entanto, comparando-se os valores da atividade enzimática dos eritrócitos normais com os dos pacientes, não há diferenças estatisticamente significantes para as mesmas concentrações de *t*BHP utilizadas (ANOVA, $p>0,05$) (Figura 44).

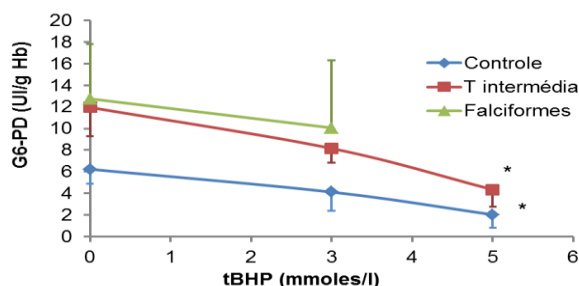


FIGURA 44– ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE G6-PD EM ERITRÓCITOS NORMAIS E DE PORTADORES DE TALASSEMIA INTERMÉDIA E ANEMIA FALCIFORME, SEM TRATAMENTO QUELANTE, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE *t*BHP.

NOTAS: 0 - valor de G6-PD basal; *t*BHP - *tert*-butilhidroperóxido; * - Diferença estatisticamente significativa da concentração de 5 mmol/L *t*BHP com os basais (sem *t*BHP) para (Tukey, $p<0,05$). Diferença estatisticamente significativa dos pacientes com os controles para as mesmas concentrações de *t*BHP (ANOVA, $p>0,05$); Tamanho amostral: normal = 20; talassemia intermédia = 4; falciformes = 10; A barra de erro representa o desvio padrão

Resultados

5.5 DOSAGEM DAS PORCENTAGENS DE HEMÓLISE

Nas Figuras 45 a 50 são apresentados os resultados obtidos para as porcentagens de hemólise. A Figura 45 mostra a porcentagem de hemólise nos eritrócitos normais submetidos à ação de 50, 75 e 100 mmoles/l do oxidante AAPH. Ocorreu um aumento significativo nas porcentagens de hemólise diretamente proporcional à concentração do oxidante, com diferenças estatisticamente significantes em relação ao valor basal (Tukey, $p < 0,05$).

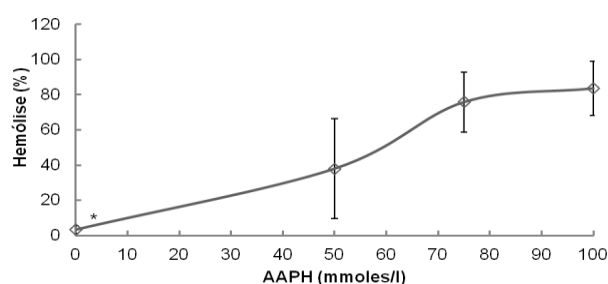


FIGURA 45 – PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS SOB AÇÃO DE AAPH.

NOTAS: 0 - valor de hemólise basal; $n = 20$, a partir de 10 amostras realizadas em duplicata.

* - diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$);

As barras de erro representam o desvio padrão.

A Figura 46 mostra as porcentagens de hemólise nos eritrócitos normais tratados com soluções de DFO nas concentrações de 1 e 2 mmoles/l e submetidos à ação de 100 mmoles/l de AAPH. A incubação somente com o DFO foi utilizada como controle e os valores da hemólise foram próximos aos basais. A DFO parece proteger os eritrócitos contra indução da hemólise, obtendo-se valores próximos aos basais, sem diferenças entre as concentrações utilizadas (1 e 2 mmoles/l).

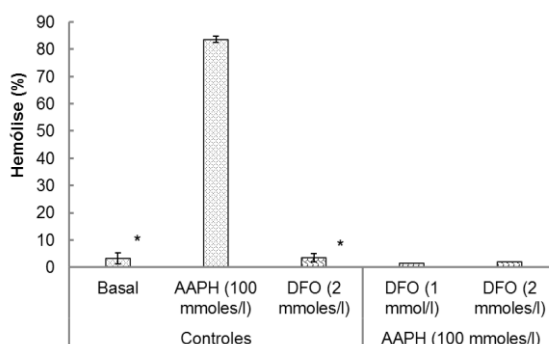


FIGURA 46 – PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFO E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 100 mmoles/l DE AAPH

NOTAS: Controles - valor de hemólise basal, amostra tratada apenas com 2 mmoles/l de DFO e apenas com 100 mmoles/l de AAPH; AAPH - dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina); DFO – desferoxamina; $n = 20$, a partir de 10 amostras realizadas em duplicata; * - diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$); As barras de erro representam o desvio padrão.

Resultados

A Figura 47 mostra as porcentagens de hemólise nos eritrócitos normais tratados com soluções de DFX nas concentrações de 1 e 2 mmoles/l e submetidos à ação de 100 mmoles/l de AAPH. A incubação somente com o DFX foi utilizada como controle e os valores permaneceram próximos aos basais. A indução da hemólise foi menor na presença do DFX em relação ao basal, sendo esta diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$).

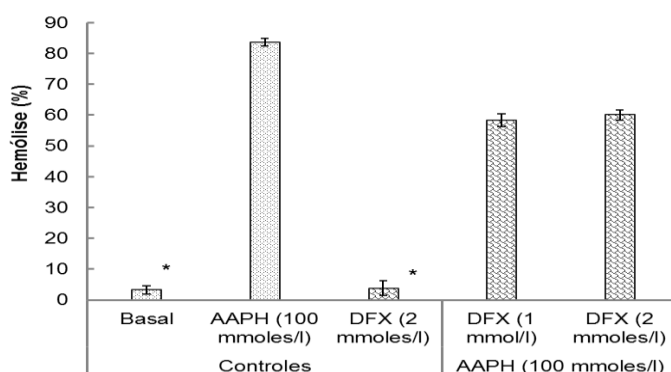


FIGURA 47 – PORCENTAGEM DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS TRATADOS COM DFX E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM 100 mmoles/l DE AAPH

NOTAS: Controles - valor de hemólise basal, amostra tratada apenas com 2 mmoles/l de DFX e apenas com 100 mmoles/l de AAPH; AAPH - dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina); DFX – deferasirox; $n = 20$, a partir de 10 amostras em duplicata; * - diferença estatisticamente significativa (Tukey, $p < 0,05$); As barras de erro representam o desvio padrão.

A Figura 48 mostra as porcentagens de hemólise em eritrócitos de pacientes em tratamento com DFO/L1 e com DFX submetidos à ação de 50, 75 e 100 mmol/L do AAPH, em comparação aos normais. Os aumentos nas porcentagens de hemólise são diretamente proporcionais à concentração do oxidante. Nos eritrócitos de pacientes DFO/L1 o aumento é inferior ao obtido para os normais, com diferenças estatisticamente significantes nas concentrações de 50 e 75 mmol/L do oxidante. No grupo DFX, o aumento parece um pouco menor em relação ao grupo controle, mas não há diferenças estatisticamente significantes (Figura 49).

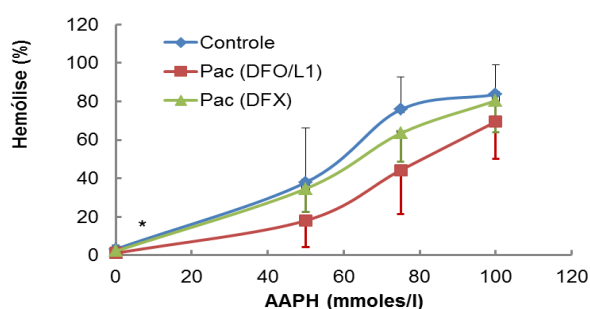


FIGURA 48— PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE AAPH.

NOTAS: 0 - valor de hemólise basal; AAPH - dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina); DFO/L1 – desferoxamina/deferiprona; DFX – deferasirox; * - diferença estatisticamente significativa com os basais (Tukey, $p < 0,05$); Tamanho amostral: Controle - $n = 20$, a partir de 10 amostras em duplicata; DFO/L1 - $n = 28$, a partir de 14 amostras em duplicata; DFX - $n = 10$, a partir de 5 amostras em duplicata; As barras de erro representam o desvio padrão.

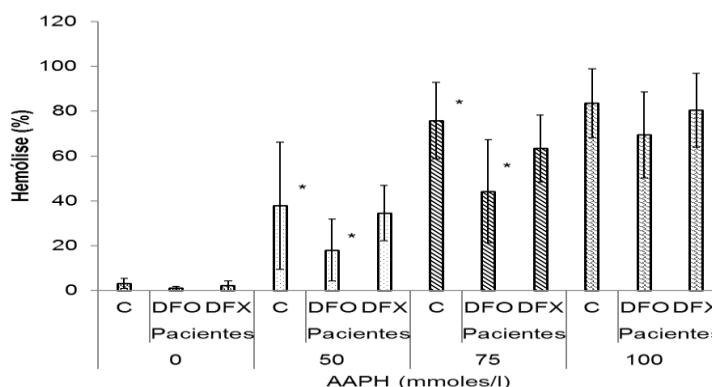


FIGURA 49 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS, DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFO + L1 E DE PACIENTES EM TRATAMENTO COM DFX SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE AAPH

NOTAS: 0 - valor de hemólise basal; AAPH - dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina); DFO/L1 – desferoxamina/deferiprona; DFX – deferasirox; * - diferença estatisticamente significativa dos pacientes DFO/L1 com os controles (C) para as mesmas concentrações de 50 e 75 mmol/L de AAPH (Tukey, $p < 0,05$); Tamanho amostral: Controle - $n = 20$, a partir de 10 amostras em duplicata; DFO/L1 - $n = 28$, a partir de 14 amostras em duplicata; DFX - $n = 10$, a partir de 5 amostras em duplicata; As barras de erro representam o desvio padrão.

Resultados

Os ensaios realizados em eritrócitos de portadores de talassemia intermédia ou de anemia falciforme sem tratamento, frente ao AAPH mostram aumentos nas porcentagens de hemólise diretamente proporcionais ao aumento nas concentrações do oxidante, similar ao grupo controle, com diferenças estatisticamente significantes em relação aos valores basais (Figura 50).

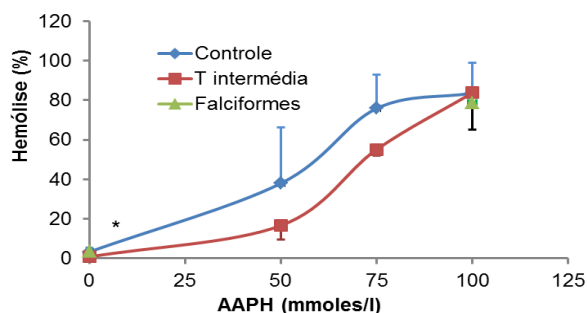


FIGURA 50— PORCENTAGENS DE HEMÓLISE EM ERITRÓCITOS NORMAIS E DE PORTADORES DE TALASSEMIA INTERMÉDIA E ANEMIA FALCIFORME SEM TRATAMENTO QUELANTE, SUBMETIDOS À AÇÃO OXIDANTE DE AAPH

NOTAS: 0 - valor de hemólise basal; AAPH - dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamida)
 * - diferença estatisticamente significante com os valores basais (Tukey, $p < 0,05$).
 Tamanho amostral: normal = 20; talassemia intermédia = 4; falciformes = 10
 A barra de erro representa o desvio padrão

6. DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A sobrecarga de ferro é a principal complicação da terapia de transfusões sanguíneas recorrentes, utilizada para o tratamento de β -talassemia, doença falciforme, síndrome mielodisplásica e outras anemias raras. Dentre os medicamentos atualmente disponíveis no Brasil para o tratamento da sobrecarga de ferro crônica, a DFO atende ao maior número de indicações e está associada a um aumento na sobrevida. Entretanto, a adesão é baixa devido às dores e desconforto impostos aos pacientes, que resultam em intolerância à administração parenteral, por infusão subcutânea. A L1, apesar de ser administrada por via oral, tem uso limitado por seu perfil de reações adversas. Esses fatos fazem com que o novo medicamento, DFX, induza maior adesão ao tratamento e melhore a qualidade de vida dos pacientes (BRASIL, 2009).

A sobrecarga de ferro crônica, devido a transfusões sanguíneas leva a significativa morbidade e mortalidade, a menos que a terapia de quelação adequada seja administrada (CAPPELLINI *et al.*, 2006). Sob condições de sobrecarga de ferro, podem ser esperados aumento da produção de radicais livres, danos peroxidativos aos tecidos e depleção de antioxidantes endógenos (LIVREA *et al.*, 1996), pois o ferro livre, em excesso, promove a reação de Fenton na qual é produzido o potente radical oxidante hidroxila (COMPORTI *et al.*, 2002).

Em estudos *in vitro*, quando os eritrócitos são incubados com agentes oxidantes, o ferro é liberado da hemoglobina ou de seus derivados, formando metemoglobina. Se o eritrócito estiver esgotado de glutathione, ocorre também peroxidação lipídica e hemólise (COMPORTI *et al.*, 2002). Porém, através da remoção de espécies intra e extracelulares de ferro, os agentes quelantes podem atuar como antioxidantes, melhorando parâmetros de estresse oxidativo (FIBACH & RACHMILEWITZ, 2010).

A exposição dos eritrócitos ao tBHP causa a oxidação da hemoglobina e danos celulares profundos através de um processo mediado por radicais livres envolvendo radicais *tert*-butoxila (LÓPEZ-REVUELTA *et al.*, 2006). O AAPH, quando adicionado a soluções aquosas de eritrócitos se decompõe, à temperatura fisiológica, gerando radical alquila que, na presença de oxigênio, é convertido ao

correspondente radical peroxil, induzindo a oxidação de lipídios na membrana (BANERJEE *et al.*, 2008).

No presente trabalho, foram realizadas dosagens de parâmetros de estresse oxidativo, com indução da oxidação em eritrócitos normais e de pacientes com sobrecarga de ferro transfusional, em tratamento com os quelantes de ferro DFO/L1 ou DFX, a fim de avaliar os possíveis efeitos antioxidantes destes fármacos. Para tanto, foram realizadas dosagens das concentrações de metemoglobina, GSH, TBARS, atividade enzimática da G6-PD e porcentagens de hemólise.

Para efeito de comparação, foram realizados os mesmos ensaios em eritrócitos isolados de pacientes portadores de β -talassemia intermédia ou de anemia falciforme, sem tratamento quelante, frente aos oxidantes. Para os pacientes com anemia falciforme foi utilizada somente uma concentração do oxidante, visto que o volume das amostras era insuficiente.

Analisando-se os dados de caracterização dos grupos de pacientes incluídos no estudo, observa-se valores de hemoglobina inferiores aos dos indivíduos normais, o que já era esperado, devido à condição clínica de anemia. O pequeno intervalo entre as transfusões sanguíneas evidencia a sobrecarga de ferro e a necessidade da terapia quelante.

6.1 CONCENTRAÇÃO DE METEMOGLOBINA

Em eritrócitos normais, observou-se aumento gradativo na concentração de metemoglobina, diretamente proporcional ao aumento na concentração do agente oxidante, com diferenças estatisticamente significantes para as concentrações de 1, 3 e 5 mmoles/l de *t*BHP (Figura 20). Krukowski *et al.* (2009) e Santos *et al.* (2009) obtiveram resultados semelhantes. Zavodnik *et al.* (1998) e Lopez-Revuelta *et al.* (2005) demonstraram que a exposição de eritrócitos ao *t*BHP resulta em diminuição exponencial do conteúdo de hemoglobina, com oxidação quase completa e formação de metemoglobina.

Incubando-se eritrócitos normais com soluções de DFO nas concentrações de 1 e 2 mmoles/l, com posterior ação de 5 mmoles/l de *t*BHP, observou-se que a concentração de metemoglobina aumenta, sem diferenças estatisticamente

significantes entre as duas concentrações da DFO (Figura 21). Resultados similares foram encontrados por Comar (2002), que observou que 4 mmoles/l de DFO não exerceram efeito protetor contra a oxidação da hemoglobina por 5 mmoles/l de tBHP. No entanto, Krukoski *et al.* (2009) verificou que não ocorreu inibição da formação de metemoglobina em amostras contendo de 1 a 4 mmoles/l de DFO seguida de oxidação com 2 mmoles/l de tBHP, mas a inibição da oxidação foi obtida com 5 mmoles/l de tBHP. Santos *et al.* (2009) demonstraram que 1, 2 e 4 mmoles/l de DFO exerceram efeito protetor contra a ação de 3 mmoles/l de tBHP, com redução de 85% na metemoglobina.

Para eritrócitos normais incubados com DFX, foram obtidos resultados similares que com a DFO, ou seja, o mesmo aumento na formação de metemoglobina com adição do oxidante, sem diferenças estatisticamente significantes entre as duas concentrações do fármaco (Figura 22). Porém, a incubação dos eritrócitos somente com o DFX, utilizada como controle, mostrou um efeito pró-oxidante do fármaco, com aumento da formação de metemoglobina, em relação à amostra sem tratamento, com valores médios de 9,48 e 3,42%, respectivamente. Santos (2008) sugeriu um efeito pró-oxidante para o agente quelante L1, porém não foram encontradas descrições sobre tal efeito para o DFX.

Nos eritrócitos de pacientes em tratamento, tanto com DFO/L1 como com DFX, submetidos à ação de 1, 3 e 5 mmoles/l de tBHP, foram observados aumentos gradativos nas concentrações de metemoglobina com o aumento da concentração do oxidante, com diferenças estatisticamente significantes para as maiores concentrações (3 e 5 mmoles/l), havendo uma resistência à baixa concentração do tBHP (1 mmol/l) (Figura 23).

No entanto, na concentração mais baixa de oxidante testada (1 mmol/l), a diferença estatisticamente significativa foi obtida entre os grupos controle e DFO/L1 (Figura 24). O resultado estatístico para os pacientes DFX fica comprometido pelo pequeno tamanho amostral conseguido durante o período de estudo, mas pode-se dizer que também há uma tendência de resistência à ação pró-oxidante, com 1 mmol/l de tBHP, nos mesmos, em relação aos eritrócitos normais, não tratados com os quelantes, que são sensíveis à concentração de 1 mmol/l de tBHP.

Nos ensaios realizados em eritrócitos isolados de pacientes portadores de talassemia intermédia ou de anemia falciforme, sem tratamento quelante, frente ao

tBHP, foi observado o mesmo padrão de aumento na formação de metemoglobina (Figura 25). Porém, estes pacientes também apresentaram menor índice de metemoglobina em relação aos de indivíduos normais com 1mmol/l de tBHP. Assim, esse fenômeno poderia sugerir um comportamento de eritrócitos isolados dos pacientes em estudo e não um possível efeito protetor dos quelantes de ferro, contra o aumento da oxidação.

Efeito semelhante já foi descrito anteriormente por Lopez-Revuelta *et al.* (2005) e Comar *et al.* (2008), em eritrócitos normais, tendo sido observado um aumento muito pequeno, quase imperceptível, na oxidação da hemoglobina na presença de baixas concentrações de tBHP (0,5 mmoles/l), o que foi atribuído a uma possível redução nos hidroperóxidos pela glutathione peroxidase, acompanhada pela oxidação do GSH aos seus dissulfetos (GSSG). Esta regeneração desaparecia, no entanto, quando eram usados 2 mmoles/l de tBHP, o que foi interpretado como uma produção suficiente de radicais livres para induzir reações oxidativas em cadeia.

Szuber *et al.* (2008) realizaram estudo avaliando tratamentos quelantes em eritrócitos de β -talassêmicos e dosaram metemoglobina como índice de dano oxidativo, observando que esses eritrócitos apresentavam níveis de metemoglobina superiores aos eritrócitos normais e que, o tratamento com todos os quelantes de ferro, *in vivo*, diminuiu consideravelmente essas taxas.

Para os resultados obtidos neste trabalho, os níveis de metemoglobina em eritrócitos talassêmicos e falciformes foram próximos aos dos eritrócitos normais. Este fato poderia sugerir que os quelantes estudados estariam mantendo os níveis basais nos pacientes tratados, porém, para confirmar esse fato, seriam necessárias dosagens de metemoglobina basais dos pacientes antes do início da terapia quelante.

6.2 CONCENTRAÇÃO DE GSH

As concentrações de GSH em eritrócitos normais submetidos à ação de 1, 3 e 5 mmoles/l do tBHP diminuíram bruscamente, com redução de mais de 80% na menor concentração (1 mmol/l), com diferenças estatisticamente significantes em relação ao valor basal, mas não entre as concentrações de tBHP (Figura 26). Santos

et al. (2009) encontraram resultados semelhantes. Comar *et al.* (2008) obtiveram redução de cerca de 50% de GSH em eritrócitos normais com 0,5 mmoles/l de tBHP, e Krukoski *et al.* (2009) verificaram diminuição em comparação ao controle com concentrações a partir de 1 mmol/l, com depleção total na presença de 4 mmoles/l de tBHP.

Zavodnik *et al.* (1998) demonstraram que houve rápida oxidação de GSH, devido à formação de poros de água na membrana celular do eritrócito após tratamento com tBHP. Com 0,5 mmoles/l de tBHP, mais de 90% do GSH foi oxidado à forma dissulfeto. Em trabalho realizado por Lopez-Revuelta *et al.* (2005) a exposição de eritrócitos a 2mmoles/l de tBHP resultou em diminuição de 70% no conteúdo de GSH, valores próximos aos obtidos neste trabalho.

A glutathione desempenha um papel fundamental na metabolização e remoção do tBHP, provavelmente através da atividade da glutathione peroxidase, que o aceita como substrato e fornece a primeira linha de defesa durante o estresse oxidativo induzido por hidroperóxidos orgânicos (TROTТА *et al.*, 1982; ZAVODNIK *et al.*, 1998). A exposição dos eritrócitos ao tBHP altera significativamente o conteúdo de diferentes formas da glutathione intracelular. A GSH é rapidamente oxidada e parte da GSSG é consumida na formação de dissulfetos mistos de glutathione com proteínas da célula. Os processos de oxidação da oxihemoglobina e peroxidação lipídica ocorrem em paralelo e começam após a conclusão da oxidação intracelular da GSH (DOMANSKI *et al.*, 2005).

Tratando-se os eritrócitos normais previamente com soluções de DFO e DFX nas concentrações de 1 e 2 mmoles/l, com posterior ação oxidante de 5 mmoles/l de tBHP, observou-se que os níveis de GSH também diminuíram, ou seja, que não houve proteção dos quelantes, sem diferença estatisticamente significativa entre as duas concentrações dos fármacos (1 e 2 mmoles/l) (Figuras 27 e 28).

Krukoski *et al.* (2009) verificaram perda mínima de GSH em amostras de eritrócitos pré-tratadas com 1 a 4 mmoles/l de DFO e induzidas à oxidação por 1 mmol/l de tBHP e Santos *et al.* (2009) obtiveram recuperação de cerca de 40% de GSH por 4 mmoles/l de DFO na oxidação induzida por 3 mmoles/l de tBHP. Com base nestes dados, poder-se-ia atribuir a não recuperação do GSH pelo DFO, neste trabalho, ao fato de que a concentração do oxidante utilizada tenha sido muito alta, visto que a depleção do GSH é quase total com pequenas concentrações do tBHP.

Um mecanismo semelhante poderia ser sugerido para o DFX, visto que os resultados obtidos foram similares, utilizando-se as mesmas concentrações do quelante e do oxidante.

Em eritrócitos de pacientes em tratamento com DFO/L1 e com DFX, submetidos à ação de 1, 3 e 5 mmoles/l do *t*BHP, observou-se pequena diminuição nas concentrações de GSH, com diferenças estatisticamente significantes apenas para as maiores concentrações (3 e 5 mmoles/l) no grupo DFO/L1 e, somente para a maior concentração (5 mmoles/l), no grupo DFX (Figura 29). Comparando-se as concentrações de GSH nos eritrócitos dos três grupos, verificou-se que a diminuição é menor nos grupos em tratamento com os quelantes de ferro em comparação ao grupo controle, em todas as concentrações (Figuras 29 e 30). Assim como foi observado para a formação de metemoglobina, os eritrócitos de pacientes em tratamento com DFO/L1 e DFX apresentaram manutenção de níveis de GSH próximos aos basais em baixas concentrações de *t*BHP.

Em comparação com os eritrócitos normais, os níveis de GSH também diminuíram em eritrócitos isolados de portadores de anemia falciforme. No entanto, os eritrócitos dos portadores de talassemia intermédia sem tratamento, apresentaram maiores concentrações que os normais frente ao agente pró-oxidante, sugerindo que os talassêmicos apresentam uma maior resistência à depleção de GSH pelo *t*BHP (Figura 31). Tem sido demonstrado que, em baixas concentrações do agente oxidante, pode ocorrer recuperação do GSH pela redução do GSSG sob ação da GSH redutase, com consumo de NADPH, em hepatócitos de ratos (LOPEZ-REVUELTA *et al.*, 2005).

De acordo com Fibach & Rachmilewitz (2010) foi demonstrado um aumento compensatório na atividade da glutathiona peroxidase em pacientes portadores de talassemias, apesar de todos os outros parâmetros antioxidantes analisados estarem significativamente deprimidos.

6.3 CONCENTRAÇÃO DAS TBARS

Atualmente, muito interesse tem sido dedicado à determinação, em fluidos corporais ou células, de malondialdeído (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica e da ativação do ciclo do ácido araquidônico. As técnicas analíticas atualmente disponíveis são baseadas na reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), originando um complexo MDA-TBA, que pode ser determinado por espectrofotometria, fluorometria ou por cromatografia líquida. O TBA também pode reagir com uma variedade de outras substâncias, como outros produtos de oxidação lipídica, pigmentos biliares, aminoácidos e açúcares, que geram cromógenos interferentes. Apesar de o MDA ser o composto mais reativo com o TBA, o termo mais correto utilizado é substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em vez de MDA para os produtos da reação com TBA (WASOWICZ *et al.*, 1993).

Os resultados obtidos para as concentrações de TBARS mostraram que em eritrócitos normais submetidos à ação de 1, 2 e 3 mmoles/l do tBHP houve aumento gradativo na sua produção, com diferenças estatisticamente significantes para as maiores concentrações (2 e 3 mmoles/l), em relação ao valor basal (Figura 32). Lopez-Revuelta *et al.* (2005) também demonstraram que a exposição de eritrócitos ao tBHP resultou em aumento considerável na produção de espécies reativas ao oxigênio e TBARS.

Em eritrócitos normais previamente tratados com soluções de DFO e DFX nas concentrações de 1 e 2 mmoles/l e posterior ação de 3 mmoles/l de tBHP, observou-se que o aumento na formação de TBARS foi menor que nos eritrócitos não tratados. Em ambos os grupos, a diferença chega perto de 50%, sem diferenças estatísticas entre as duas concentrações dos fármacos (1 e 2 mmoles/l) (Figuras 33 e 34). Estes resultados sugerem uma possível proteção de ambos os quelantes de ferro contra a peroxidação lipídica da membrana, em eritrócitos normais. Fernandes *et al.* (2000) observaram que o DFO preveniu a produção de TBARS, induzida por cromato, em eritrócitos humanos normais. Análises longitudinais em estudo de Walter *et al.* (2008) mostraram que os níveis de malondialdeído (TBARS) foram controlados tanto por DFO como por DFX.

Nos eritrócitos de pacientes em tratamento com DFO/L1 e DFX submetidos à ação de 1, 2 e 3 mmoles/l do oxidante, observou-se aumento na formação de

TBARS diretamente proporcional à concentração do oxidante, mas com diferenças estatisticamente significantes somente na maior concentração (3 mmoles/l), havendo uma resistência às baixas concentrações do tBHP (1 e 2 mmoles/l) para ambos os tratamentos, em relação ao grupo controle (Figura 35). No entanto, não há diferença estatística nos níveis de TBARS em pacientes tratados com quelantes comparados com indivíduos normais para as mesmas concentrações de tBHP utilizadas (Figura 36), isto pode ter ocorrido devido à grande variabilidade individual dos resultados obtidos, gerando um amplo coeficiente de variação.

Quando foram realizados ensaios em eritrócitos isolados de pacientes portadores de talassemia intermédia ou de anemia falciforme sem tratamento, frente ao agente oxidante, verificou-se que as concentrações de TBARS aumentam com o aumento da concentração do oxidante, um pouco mais acentuado nos pacientes em relação ao grupo controle, porém, sem diferenças estatisticamente significantes entre as médias, para as mesmas concentrações de tBHP utilizadas (1 a 3 mmoles/l).

Em estudo realizado por Livrea *et al.* (1996) em pacientes talassêmicos com sobrecarga de ferro, as concentrações séricas de malondialdeído, hidroperóxidos lipídicos e carbonilas de proteínas aumentaram cerca de duas vezes, em comparação com controles sadios. Observou-se que estes pacientes, continuamente expostos à lesão oxidativa induzida pelo ferro, possuem um padrão extremamente alterado de todos os antioxidantes no soro. Estes resultados suportam a observação de um possível efeito protetor dos agentes quelantes de ferro em eritrócitos, observado mais claramente nos normais, mas também sugestivo nos pacientes.

6.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA G6-PD

Os resultados obtidos para as atividades enzimáticas da G6-PD mostraram diminuição das mesmas com a adição do oxidante, com diferenças estatisticamente significantes em relação aos valores basais e entre as diferentes concentrações de tBHP (Figura 38). Müller *et al.* (1991) demonstraram que a atividade da enzima foi levemente inibida por radicais alquilperoxil e alcóxil, gerados pela decomposição catalítica do tBHP; e Santos *et al.* (2009) observaram ligeira diminuição, apenas na

presença de 5 mmol/L do tBHP. No entanto, Chaves *et al.* (2008) e Krukowski *et al.* (2009) verificaram um decréscimo significativo na atividade enzimática com a adição do oxidante.

Em eritrócitos normais, previamente tratados com soluções de DFO e DFX nas concentrações de 1 e 2 mmol/L e, posteriormente, submetidos à ação oxidante de 5 mmol/L de tBHP, também houve diminuição na atividade da G6-PD, sem diferenças estatisticamente significantes entre as duas concentrações dos fármacos (1 e 2 mmol/L) (Figuras 39 e 40). Resultados semelhantes, para a DFO, foram obtidos por Krukowski (2006) e Santos *et al.* (2008).

Em eritrócitos de pacientes em tratamento com DFO/L1 e com DFX submetidos à ação de 3 e 5 mmol/L do tBHP, houve a mesma diminuição na atividade da enzima com o aumento da concentração do oxidante, com diferenças estatisticamente significantes, sugerindo que os quelantes de ferro não são capazes de proteger esses eritrócitos contra a oxidação da enzima. Comparando-se as atividades da G6-PD nos eritrócitos dos três grupos, verifica-se que, apesar de não haver diferenças estatisticamente significantes, os valores basais são ligeiramente maiores nos pacientes em relação aos normais (Figuras 41 e 42).

Os resultados obtidos para os eritrócitos isolados de pacientes portadores de talassemia intermédia ou de anemia falciforme sem tratamento, frente ao agente oxidante, mostraram que nos pacientes a atividade enzimática é sempre maior que nos indivíduos normais, para as mesmas concentrações do pró-oxidante, embora também ocorra diminuição na atividade com o aumento na concentração de tBHP, com diferenças estatisticamente significantes entre os valores basais e 5 mmol/L de tBHP (Figura 43).

A via das pentoses fosfato é estimulada sob condições de estresse oxidativo, causada por hidróperóxidos ou por algum agente depressor de GSH (CHAVES *et al.*, 2008). A G6-PD catalisa o primeiro passo da via das pentoses fosfato, produzindo NADPH, que protege os eritrócitos contra danos oxidativos, sendo uma enzima de defesa antioxidante, considerada como modulador essencial nas células. Então, células deficientes em G6-PD, especialmente os eritrócitos são suscetíveis a danos causados por espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (FARHUD & YAZDANPANAHI, 2008).

De acordo com Santos (2008) as atividades da G6-PD costumam ser elevadas em β -talassêmicos em comparação aos indivíduos normais, devido à necessidade da presença da enzima para regenerar a GSH e manter a integridade celular, uma vez que os pacientes apresentam tendência à exacerbação do processo oxidativo. O mesmo obteve valores elevados de atividade da G6-PD em eritrócitos de β -talassêmicos menor sem tratamento em comparação com β -talassêmicos maior em terapia quelante, explicando este fato, possivelmente, pelas alterações metabólicas sofridas pelos pacientes destinadas a manter o equilíbrio funcional dos eritrócitos.

6.5 HEMÓLISE

A hemólise dos eritrócitos humanos é um bom modelo para estudar os danos induzidos por radicais livres oxidativos e avaliar a atividade antioxidante de novos compostos. Durante o estresse oxidativo, os estoques celulares de GSH estão esgotados e a aplicação de antioxidantes exógenos pode protegê-los, impedindo-os de serem consumidos nas reações com os radicais livres (BANERJEE *et al.*, 2008).

Durante a realização dos testes para validação da metodologia utilizada, verificou-se que o agente oxidante tBHP não induzia hemólise em eritrócitos em extensão considerável permitindo observar a possível proteção dos quelantes de ferro. Devido a isso, para esta técnica foi utilizado o agente oxidante AAPH. NIKI *et al.* (1988) e KONDO *et al.* (1997) verificaram que o AAPH induz hemólise através da geração de radicais aquosos peróxil, por decomposição térmica aeróbica e a extensão da hemólise é diretamente proporcional à quantidade dos radicais formados.

Submetendo-se os eritrócitos normais à ação de 50, 75 e 100 mmoles/l do AAPH ocorreu um aumento significativo nas porcentagens de hemólise, com o aumento da concentração do oxidante, com diferenças estatisticamente significantes em relação ao valor basal (Figura 44). Niki *et al.* (1988) obtiveram resultados semelhantes em eritrócitos de coelhos e verificaram que quanto maior a concentração do AAPH, mais cedo ocorreu a hemólise. No entanto, pouca hemólise foi observada quando a incubação foi realizada sob atmosfera de nitrogênio,

sugerindo que os radicais de carbono derivados do AAPH somente atacam e oxidam as membranas na presença de oxigênio.

Tratando-se os eritrócitos normais com soluções de DFO nas concentrações de 1 e 2 mmoles/l, observou-se proteção total contra indução da hemólise (Figura 45). No tratamento com soluções de DFX, nas mesmas concentrações, houve proteção parcial, ocorrendo $60 \pm 11\%$ de hemólise nos eritrócitos tratados com DFX e $83 \pm 15\%$ somente com o AAPH, sendo a diferença estatisticamente significativa (Figura 46).

Em experimentos de Comporti *et al.* (2002) nos quais eritrócitos de ratos foram pré-incubados com um grande excesso de DFO, lavados, esgotados de GSH e então incubados com um agente oxidante, o ferro liberado foi quelado a nível intracelular, prevenindo a peroxidação lipídica e a hemólise. O mesmo não ocorreu quando a quantidade intracelular de DFO não foi suficiente para quelar todo o ferro liberado. Isto ocorre possivelmente pelo fato de a DFO penetrar nas células apenas em pequenas quantidades.

Realizando-se a dosagem das porcentagens de hemólise em eritrócitos de pacientes em tratamento com DFO/L1 e DFX houve aumento na porcentagem de hemólise com o aumento da concentração do oxidante, com diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações, para ambos os tratamentos. Comparando-se os resultados dos três grupos, no entanto, observou-se que nos pacientes o aumento na hemólise é inferior ao dos indivíduos normais, com diferenças estatisticamente significantes para cada concentração do oxidante (Figuras 47 e 48).

Estes resultados indicam que os agentes quelantes de ferro são capazes de proteger eritrócitos normais e de pacientes contra indução de hemólise, provavelmente devido à diminuição do processo oxidativo por sua capacidade de retirar do meio uma potencial fonte geradora de radicais livres, o íon ferro. Santos *et al.* (2009) verificaram que as amostras tratadas com DFO não apresentaram proteção contra a hemólise, no entanto, o tBHP foi utilizado como agente oxidante e a extensão da hemólise foi muito pequena, dificultando a interpretação do efeito protetor. Por outro lado, Niki *et al.* (1988) descreveram que antioxidantes solúveis em água, com quebra de cadeia, suprimiram a hemólise em eritrócitos de coelho induzidas pelo AAPH.

Em ensaios realizados em eritrócitos isolados de pacientes portadores de talassemia intermédia ou de anemia falciforme sem tratamento, frente ao agente oxidante, observou-se aumento nos valores com aumento da concentração de AAPH, similar ao grupo controle, com diferenças estatisticamente significantes em relação ao valor basal (Figura 49).

6.6 ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS

Foi considerado que as amplas variações interindividuais em relação à capacidade antioxidante podem afetar a suscetibilidade individual contra reações oxidativas deletérias (ANDERSEN *et al.*, 1997). Além disso, o uso de métodos *in vitro* para avaliar o potencial efeito benéfico de antioxidantes apresenta dificuldades, pois as reações envolvidas na oxidação e redução são bastante sensíveis ao meio químico no qual ocorrem, às concentrações de oxigênio, íons de metais de transição e numerosos compostos de atividade redox. Portanto, não é surpresa que resultados contraditórios com um único suposto antioxidante possam ser obtidos usando-se sistemas *in vitro* (ANDERSON & PHILLIPS, 1999). Nos resultados obtidos neste estudo foi observada uma ampla variabilidade individual para alguns parâmetros analisados, o que pode ter dificultado as significâncias estatísticas, principalmente por se ter um número limitado de amostras de pacientes.

Tem-se demonstrado, em diversos estudos, que os eritrócitos de pacientes portadores de talassemias, anemia falciforme e outras anemias, expostos a frequente dano oxidativo, apresentam parâmetros de estresse oxidativo alterados (LIVREA *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 2009; CLASTER *et al.*, 2009; GHARAGOZLOO *et al.*, 2009; NUR *et al.*, 2011).

De acordo com Claster *et al.* (2009), as hemoglobinopatias são caracterizadas por dano oxidativo devido ao aumento no consumo de oxigênio em repouso e hemoglobina livre pró-oxidativa na circulação, tendo sido demonstrados níveis alterados de biomarcadores oxidativos no plasma de pacientes com anemia falciforme (NUR *et al.*, 2011) e talassemia, não transfundidos. Nestes últimos, a oxidação parece ser provocada, inclusive pelo efeito tóxico das cadeias de globina desemparelhadas na membrana (SCOTT *et al.*, 1993). Além disso, esses

biomarcadores também são elevados nesses mesmos pacientes, quando cronicamente transfundidos, devido aos níveis de ferro não ligado à transferrina.

No presente trabalho, comparando-se os resultados dos valores basais obtidos para os parâmetros de estresse oxidativo testados, nos pacientes em tratamento com os quelantes de ferro e em indivíduos normais, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Desta forma, poderia ser suposto que os agentes quelantes estejam exercendo alguma proteção em tais eritrócitos. No entanto, para confirmação desta hipótese, seriam necessários dados dos parâmetros oxidativos, antes e depois do início da terapia quelante de ferro.

A grande maioria dos pacientes que recebem frequentes transfusões sanguíneas e está exposta a sobrecarga de ferro são portadores de β -talassemia maior. No entanto, não foi possível realizar um estudo comparativo dos efeitos dos agentes quelantes de ferro com pacientes portadores desta patologia sem tratamento pois, todos os atendidos no HEMEPAR estavam, na ocasião, em terapia quelante de ferro. Uma tentativa de comparação foi realizada com um pequeno número de pacientes portadores de β -talassemia intermédia e anemia falciforme, que não estavam em tratamento, porém, também não estavam em risco de sobrecarga de ferro.

Os resultados obtidos, tratando-se os eritrócitos, tanto normais como os dos pacientes, com agentes oxidantes confirmam estudos realizados anteriormente, em que se observaram alterações significativas nos marcadores celulares de estresse oxidativo (LIVREA *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 2009; CLASTER *et al.*, 2009; GHARAGOZLOO *et al.*, 2009; NUR *et al.*, 2011).

A avaliação de um possível efeito protetor dos agentes quelantes sobre os danos oxidativos induzidos nos eritrócitos demonstrou uma proteção parcial, observada principalmente nos testes de dosagem das TBARS e porcentagens de hemólise. Comparando-se os dois agentes quelantes, pode-se sugerir ação semelhante, neste estudo, para os parâmetros analisados.

7. CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O estudo da ação de quelantes de ferro e do estresse oxidativo em eritrócitos de indivíduos normais e de pacientes portadores de sobrecarga de ferro transfusional permitiu concluir que:

a) Os eritrócitos de portadores de sobrecarga de ferro transfusional, em tratamento com quelantes de ferro, apresentaram parâmetros basais de estresse oxidativo similares aos dos eritrócitos normais, sugerindo uma possível proteção dos quelantes contra oxidação espontânea, *in vivo*.

b) O estresse oxidativo, induzido por tBHP, ocasionou:

- aumento na formação de metemoglobina de mais de 10 vezes nos grupos controle e tratados com DFO/L1 ou DFX (5 mmoles/l);
- diminuição nos níveis de GSH de 93% no grupo controle e de aproximadamente 50% nos grupos tratados com DFO/L1 ou DFX (5 mmoles/l);
- aumento na formação de TBARS de aproximadamente 40 vezes nos grupos controle e tratado com DFX e de 30 vezes no grupo tratado DFO/L1;
- diminuição da atividade de G6-PD de 63% no grupo controle e cerca de 80% nos grupos tratados com DFO/L1 ou DFX, respectivamente.

c) O estresse oxidativo, induzido por AAPH (75 mmoles/l) ocasionou:

- Aumentos na porcentagem de hemólise de 2,7 para 75% nos eritrócitos normais e de 1,0 para 55% e de 1,3 para 60% nos grupos DFO/L1 e DFX, respectivamente.

d) O emprego de DFO 1 e 2 mmoles/l e DFX 1 e 2 mmoles/l, sob estresse oxidativo:

- não protegeu contra a formação de metemoglobina, a diminuição do GSH ou a redução da atividade da G6-PD;
- protegeu parcialmente contra a formação de TBARS e a indução de hemólise.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que há uma proteção parcial dos eritrócitos de pacientes em tratamento com quelantes de ferro contra oxidação, observados principalmente na formação de TBARS e porcentagens de hemólise. Além disso, foram obtidos valores de parâmetros de estresse oxidativo basais similares para os pacientes e o grupo controle, podendo evidenciar também uma proteção quelante. No entanto, para comprovar esses resultados seriam necessárias dosagens desses parâmetros antes e depois de iniciada a terapia quelante.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AESSOPOS, A.; FARMAKIS, D.; KARAGIORGA, M.; VOSKARIDOU, E.; LOUTRADI, A.; HATZILIAMI, A.; JOUSSEF, J.; ROMBOS, J.; LOUKOPOULOS, D. Cardiac involvement in thalassemia intermedia: a multicenter study. **Blood**, n. 97, p. 3411-3416, 2001.

ANDERSON, D. PHILLIPS, B. J. Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**. v. 37, p. 1015-1025, 1999.

ANDERSEN, H. R.; NIELSEN, J. B.; NIELSEN, F.; GRANDJEAN, P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocyte. **Clinical Chemistry**. v. 43, n. 4, p. 562-568, 1997.

ANDREWS, N. C. Disorders of iron metabolism. **The New England Journal of Medicine**. Boston, v. 341, n. 26, p. 1986-1995, Dez. 1999.

BADAWI, M. A.; VICKARS, L. M.; CHASE, J. M.; LEITCH, H. A. Red blood cell transfusion independence following the initiation of iron chelation therapy in myelodysplastic syndrome: case report. . **Advances in Hematology**. v. 2010, p. 1 - 5, 2010.

BANERJEE, A.; KUNWAR A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of red blood cells. **Chemico-Biological Interactions**. Santa Fe, v. 172. n. 2. p. 134-139, jul. 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, P. D. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113 – 123, 2006.

BENDOVA, P.; MACKOVA, E.; HASKOVA, P.; VAVROVA, A.; JIRKOVSKY, E.; STERBA, M.; POPELOVA, O.; KALINOWSKI, D. S. KOVARIKOVA, P.; VAVROVA, K.; RICHARDSON, D. R.; SIMUNEK, T. Comparison of clinically used and experimental iron chelators for protection against oxidative stress-induced cellular injury. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, p. 1105–1114, 2010.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. **Química Nova**. São Paulo, v. 25, n. 6, Dez. 2002.

BEUTLER, E.; DERN, R. J.; ALVING, A. S. The hemolytic effect of primaquine. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, v. 45, p. 40-45, 1963.

BORGNA-PIGNATTI, C.; GALANELLO, R. Thalassemias and Related Disorders: Quantitative Disorders of Hemoglobin Synthesis. In: GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 11. Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2004. p. 2646 – 2745.

BORGNA-PIGNATTI, C.; CAPPELLINI, M.D.; STEFANO, P.; DEL VECCHIO, G.C.; FORNI, G.L.; GAMBERINI, M.R.; GHILARDI, R.; PIGA, A.; ROMEO, M.A.; ZHAO, H.; CNAAN, A. Cardiac morbidity and mortality in deferoxamine or deferiprone treated patients with thalassemia major. **Blood**. Washington, DC, v. 107, n. 9, p. 3733 – 3737, may 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS). **Boletim brasileiro de avaliação de tecnologias em saúde (BRATS)**. Ano IV, n. 7, Março de 2009.

BRITTENHAM, G. M.; GRIFFITH, P. M.; NIENHUIS, A. W.; MCLAREN, C. E.; YOUNG, N. S.; TUCKER, E. E.; ALLEN, C. J. FARRELL, D. E.; HARRIS, J. W. Efficacy of deferoxamine in preventing complications of iron overload in patients with thalassemia major. **The New England Journal of Medicine**. Boston, v. 331, n. 9, p. 567-573, 1994.

BRITTENHAM, G.M. Iron-chelating therapy for transfusional iron overload. **The New England Journal Of Medicine**. Boston, v. 364, n. 2, p. 146-156, jan. 2011.

BROVELLI, A. Erythrocyte membrane damage in hemolytic anemias. In: HARRIS, J. R. **Blood Cell Biochemistry**. New York: Plenum Publishing, 1990. p. 455 - 474.

BRUIN, G. J. M.; FALLER, T.; WIEGAND, H.; SCHWEITZER, A; NICK, H.; SCHNEIDER, J.; BOERNSEN, K. O.; WALDMEIER, F. Pharmacokinetics, distribution, metabolism, and excretion of deferasirox and its iron complex in rats. **Drug Metabolism and Disposition**. v. 36, n. 12, p. 2523-2538, 2008.

CALVO, C. L.; **Red Cell Biology: Erythropoiesis, Apoptosis, and Metabolism**. LabM 321 Introduction to Clinical Hematology. University of Washington. Disponível em: <<http://faculty.washington.edu/calvoc/DocumentsLabM321/Lectures/3RBC.ppt>> Acesso em 25/07/2011.

CAMASCHELLA, C.; CAPPELLINI, M. D. Thalassemia intermédia. **Haematologica**. n. 80, p. 58 – 68, 1995.

CANÇADO, R.D. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 316 - 326, jul/set. 2007.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 204, 2007.

CAPPELLINI, M.D.; COHEN, A.; PIGA, A.; BEJAOU, M.; PERROTTA, S.; AGAOGLU, L.; AYDINOK, Y.; KATTAMIS, A.; KILINC, Y.; PORTER, J.; CAPRA, M.; GALANELLO, R.; FATTOUM, S.; DRELICHMAN, G.; MAGNANO, C.; VERISSIMO, M.; ATHANASSIOU-METAXA, M.; GIARDINA, P.; KOURAKLI-SYMEONIDIS, A.; JANKA-SCHAUB, G.; COATES, T.; VERMYLEN, C.; OLIVIERI, N.; THURET, I.; OPITZ, H.; RESSAYRE-DJAFER, C.; MARKS, P.; ALBERTI, D. A phase 3 study of deferiasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with β -thalassemia. **Blood**, Washington, D.C., v. 107, n. 9, p. 3455-3462, 2006.

CAPPELLINI, M.D.; BEJAOU, M.; AGAOGLU, L.; PORTER, J.; COATES, T.; JENG, M.; LAI, M. E.; MANGIAGLI, A.; STRAUSS, G.; GIROT, R.; WATMAN, N.; FERSTER, A.; LOGGETTO, S.; ABISH, S.; CARIO, H.; ZOUMBOS, N.; VICHINSKY, E.; OPITZ, H.; RESSAYRE-DJAFER, C.; ABETZ, L.; ROFAIL, D.; BALADI, J. F. Prospective evaluation of patient-reported outcomes during treatment with deferiasirox or deferioxamine for iron overload in patients with β -thalassemia. **Clinical Therapeutics**. v. 29, n. 5, p. 909-917, 2007.

CASTRO, M. A. C. **Estudo comparativo da produção de radicais livres e catalase nos exercícios de intensidade e duração moderadas**. Dissertação (Mestrado em Educação física) Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2003.

CESQUINI, M.; TORSONI, M. A.; STOPPA, G. R.; OGO, S. H. t -BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonóides. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 57. p. 124-129, mai. 2003.

CHAVES, M. A. F.; LEONART, M. S. S. NASCIMENTO, A. J. Oxidative process in erythrocytes of individuals with hemoglobin S. **Hematology**. v. 13, n. 3, p. 187 – 192, 2008.

CHAUDHURI, S.; BANERJEE, A.; BASU, K.; SENGUPTA, B.; SENGUPTA, P. K. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. **International Journal of Biological Macromolecules**. Greeley, v. 41. p. 42 – 48, 2007.

CIANCIARULLO, M. A.; DURANTE, A. S.; CARVALLO, R.; VOEGELS, R.; TAKAHASHI, G.; VAZ, F. A. C. **Perda auditiva neonatal associada a hiperbilirrubinemia por deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase: relato de caso**. Disponível em < <http://www.pediatrasiapaulo.usp.br/upload/html/1124/body/08.htm>>. Acesso em 19/10/201.

CLARO, L.M.; LEONART, M.S.S.; COMAR, S.R.; NASCIMENTO, A.J. Effect of vitamins C and E on oxidative processes in human erythrocytes. **Cell Biochemistry and Function**. v. 24, p. 531 – 535, 2006.

CLASTER, S.; WOOD, J. C.; NOETZLI, L.; CARSON, S. M.; HOFSTRA, T. C.; HANNA, R.; COATES, T. D. Nutritional deficiencies in iron overloaded patients with Hemoglobinopathies. **American Journal of Hematology**. v. 84, p. 344-328, 2009.

COMAR, S. R. **Ação de quercetina, rutina e extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera* em eritrócitos humanos submetidos a sobrecarga oxidativa**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

COMAR, S. R.; NASCIMENTO, A. J.; NAKASHIMA, T.; MIGUEL, O. G.; LEONART, M. S. S. Ação de extrato hidroalcoólico de uvas pretas (*Vitis Vinifera*) em eritrócitos humanos e sobrecarga oxidativa por *tert*-butil hidroperóxido. **Revista eletrônica de Farmácia**. v. 2, p. 54-60, 2008.

COMPORTI, M. SIGNORINI, C. BUONOCORE, G. CICCOLI, L. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 32, n. 7, p. 568 – 576, 2002.

COVAS, D. T.; UBIALI, E. M. A.; SANTIS, G. C.; **Manual de Medicina Transfusional**. São Paulo: Atheneu, 2010.

DELEA, T. E.; SOFRYGIN, O.; THOMAS, S. K.; BALADI, J-F.; PHATAK, P. D.; COATES, T. D. Cost effectiveness of once-daily oral chelation therapy with deferasirox versus infusional deferoxamine in transfusion-dependent thalassaemia patients: US healthcare system perspective. **Pharmacoeconomics**. v. 25, n. 4, p. 329-342, 2007.

DEUTICKE, B.; HELLER, K. B.; HAEST, C. W. M. Progressive oxidative membrane damage in erythrocytes after pulse treatment with t-butylhydroperoxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 899, p. 113-124, 1987.

DOMANSKI, A. V.; LAPSHINA, E. A.; ZAVODNIK, I. B. Oxidative processes induced by tert-butyl hydroperoxide in human red blood cells: chemiluminescence studies. **Biochemistry**, Moscou, v. 70, n. 7, p. 761- 769, 2005.

DRAHOTA, Z.; KŘIVÁKOVÁ, P.; ČERVINKOVÁ, Z.; KMONÍČKOVÁ, E.; LOTKOVÁ, H.; KUČERA, O.; HOUSTĚK, J. *Tert*-butyl hydroperoxide selectively inhibits mitochondrial respiratory-chain enzymes in isolated rat hepatocytes. **Physiological Research**.Praga, v. 54, p. 67-72, 2005.

ESPOSITO, B. P.; BREUER, W.; SIRANKAPRACHA, P.; POOTRAKUL, P.; HERSHKO, C.; CABANTCHIK, Z. I. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. **Blood**. v. 102, n. 7, p. 2670-2677, 2003

EXJADE/deferasirox: comprimidos dispersíveis. Responsável técnico: Marco A. J. Siqueira. Suíça: Novartis Pharma, 2009. 1 bula de medicamento.

FABRON JR, A.; TRICTA, F. Terapia quelante oral com deferiprona em pacientes com sobrecarga de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 25, n. 3, 2003 . Disponível em : <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842003000300010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 02/07/2010.

FARHUD, D. D.; YAZDANPANA, L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. **Iranian Journal of Public Health**. v. 37, n. 4, p. 1-18, 2008.

FERNANDES, M. A. S.; GERALDES, C. F. G. C.; OLIVEIRA, C. R.; ALPOIM, M. C. Chromate-induced human erythrocytes haemoglobin oxidation and peroxidation: influence of vitamin E, vitamin C, salicylate, deferoxamine and *N*-ethylmaleimide. **Toxicology Letters**. v. 114, n. 1-3, p. 237-243, 2000.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43, n. 1, p. São Paulo, Jan./Mar. 1997.

FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. A. The role of antioxidants and iron chelators in the treatment of oxidative stress in thalassemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**. New York, v. 1202, p. 10-16, 2010.

FORSBECK, K. The transferrin receptor and iron accumulation in erythroid cells. In: HARRIS, J. R. **Blood Cell Biochemistry**. New York: Plenum Publishing, 1990. p. 403 – 427.

GAW, A.; COWAN, R. A.; O'REILLY, D. S. J.; STEWART, M. J.; SHEPHERD, J. **Clinical Biochemistry**. 2.ed. Churchill Livingstone, 1999.

GHARAGOZLOO, M.; MOAYEDIB, B.; ZAKERINIA, M.; HAMIDID, M.; KARIMIE, M.; MARACYG, M.; AMIRGHOFRAH, Z. Combined therapy of silymarin and desferrioxamine in patients with β -thalassemia major: a randomized double-blind clinical trial. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. v. 23, p. 359–365, 2009.

GHOTI, H. FIBACH, E.; MERKEL, D.; PEREZ-AVRAHAM, G.; GRISARIU, S.; RACHMILEWITZ, E. A. Changes in parameters of oxidative stress and free iron biomarkers during treatment with deferasirox in iron-overloaded patients with myelodysplastic syndromes. **Haematologica**. v. 95, n. 8, p. 1433-1434, 2010.

GLICKSTEIN, H.; BEN EL, R.; LINK, G.; BREUER, W.; KONIJN, A. M.; HERSHKO, C.; NICK, H.; CABANTCHIK, Z. I. Action of chelators in iron-loaded cardiac cells: accessibility to intracellular labile iron and functional consequences. **Blood**. v. 108, p. 3195-3203, 2006.

GREENBERG, P. L.; KOLLER, C. A.; CABANTCHIK, Z. I.; WARSI, G.; GLYNOS, T.; PALEY, C.; SCHIFFER, C. Prospective assessment of effects on iron-overload parameters of deferasirox therapy in patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia Research**. v. 34, n. 12, p.1560-1565, 2010.

GRIMES, A. T. **Human red cell metabolism**. Oxford: Blackwell, 1980, 384p.

HEYNEN, N. J. Ultrastructural changes during erythroid development. In: HARRIS, J. R. **Blood Cell Biochemistry**. New York: Plenum Publishing, 1990. p. 1 – 26.

JO'Z'WIKA, M.; JO'Z'WIKA, M.; JO'Z'WIKB, M.; SZCZYPKA, M.; GAJEWSKA, J.; LASKOWSKA-KLITA, T. Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. **Clinica Chimica Acta**. v. 267, p. 129-142, 1997.

KONDO, H.; TAKAHASHI, M.; NIKI, E. Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. **Febs Letters**. v. 413, n. 2, p.236-238, 1997.

KORNBERG, A. *et al.* **Methods in enzymology**. New York: Academia Press, 1955. p. 323.

KRUKOSKI, D. W.; COMAR, S. R.; CLARO, L. M.; LEONART, M. S. S.; NASCIMENTO, A. J. Effect of vitamin C, deferoxamine, quercetin and rutin against tert-butyl hydroperoxide oxidative damage in human erythrocytes. **Hematology**. v. 14, n. 3, p. 168 – 172, 2009.

KUSHNER, J. P.; PORTER J.B.; OLIVIERI, N.F. Secondary iron overload. **Hematology**. Washington, DC, p. 47-61. jan. 2001.

LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. **Hematologia Prática de Dacie e Lewis**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

LIVREA, M. A.; TESORIERE, L.; PINTAUDI, A. M.; CALABRESE, A.; MAGGIO, A.; FREISLEBEN, H. J.; D'ARPA, D.; D'ANNA, R.; BONGIORNO, A. Oxidative stress and antioxidant status in β -thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. **Blood**, v. 88, n. 9, p. 3608 – 3614, 1996.

LOHR, G. W. WALLER, H. D. **Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Methods of enzymatic analysis**. 3. ed. Varlay Chemie, Wheim, 1974. p. 636.

LÓPEZ-REVUELTA, A.; SÁNCHEZ-GALLEGO, J. I.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ-YAGÜE, J.; LLANILLO, M. Increase in vulnerability to oxidative damage in cholesterol-modified erythrocytes exposed to *t*-BuOOH. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**. v. 1734, n. 1, p. 74-85, mai. 2005.

LÓPEZ-REVUELTA, A.; SÁNCHEZ-GALLEGO, J. I.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ-YAGÜE, J.; LLANILLO, M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**. v. 161, p. 79 – 91. 2006.

MAKAREM, A. **Clinical Chemistry – Principles and Techniques**. 2.ed. R.F. Henry; D.C. Cannon; J.W. Wilkerman Editors. Harper and How, Hagerstown, 1974. p. 1128 – 1135.

MCLELLAN, S. A.; MCCLELLAND, D. B. L.; WALSH, T. S. Anaemia and red blood cell transfusion in the critically ill patient. **Blood Reviews**, v. 17, p. 195 – 208, 2003.

MÜLLER, K.; SEIDEL, M.; BRAUN, C.; ZIEREIS, K.; WIEGREBE, W. Dithranol, glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibition and active oxygen species. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**. v. 41, n. 11, p. 1176-1181, 1991.

NAOUM, P. C. O eritrócito: principais enzima eritrocitárias. **Academia de ciência de tecnologia**. Disponível em:
<<http://www.ciencianews.com.br/doencaeritro/Eritrocito%20%20%2014/enzeritro.ht>>. Acesso em 19/10/2011.

NAOUM, P.C. RADISPIEL, J.; MORAES, M. S. Dosagem espectrométrica de metahemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São Paulo, v. 26, n. 1, p. 19-22, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: Princípios de Bioquímica. 4. ed. New York: W.H. Freeman and Co., 2006. p. 160 – 173.

NEUFELD, E.J. Oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major: new data, new questions. **Blood**, Washington, DC, v. 107, n. 9, p. 3436 - 3441, mai. 2006.

NIKI, E.; KOMURO, E.; TAKAHASHI, M.; URANOZ, S.; ITOS, E.; TERAOE, K. Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 263, n. 36, p. 19809-19814, 1988.

NIKI, E.; YAMAMOTO, Y.; KOMURO, E.; SATO, K. Membrane damage due to lipid oxidation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 201S – 205S, 1991.

NUR, E.; BIEMOND, B. J.; OTTEN, H. M.; BRANDJES, D. P.; SCHNOG, J. J. B. Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. **American Journal of Hematology**. v. 86, p. 484–489, 2011.

OTTO-DUESSEL, M.; BREWER, C. GONZALEZ, I.; NICK, H.; WOOD, J. C. Safety and efficacy of combined chelation therapy with deferasirox and deferoxamine in a gerbil model of iron overload. **Acta Haematologica**. v. 120, p. 123-128, 2008.

PENNELL, D. J.; BERDOUKAS, V.; KARAGIORGA, M.; LADIS, V.; PIGA, A.; AESSOPOS, A.; GOTSIS, E. D.; TANNER, M. A.; SMITH, G. C.; WESTWOOD, M. A.; WONKE, B.; GALANELLO, R. Randomized controlled trial of deferiprone or deferoxamine in beta-thalassemia major patients with asymptomatic myocardial siderosis. **Blood**. Washington, DC, v. 107, p. 3738-3744, 2006.

PERKINS, S. L. Examination of the blood and bone marrow. In: GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 11. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2004. p. 27 – 74.

PIPERNO, A. Classification and diagnosis of iron overload. **Haematologica**. v. 83, p. 447-455, 1998.

PORTER, J.; GALANELLO, R.; SAGLIO, G.; NEUFELD, E. J.; VICHINSKY, E.; CAPPELLINI, M. D.; OLIVIERI, N.; PIGA, A.; CUNNINGHAM, M. J.; SOULIE` RES, D.; GATTERMANN, N.; TCHERNIA, G.; MAERTENS, J.; GIARDINA, P.; KWIATKOWSKI, J.; QUARTA, G.; JENG, M.; FORNI, G. L.; STADLER, M.; CARIO, H.; DEBUSSCHER, L.; PORTA, M. D.; CAZZOLA, M.; GREENBERG, P.; ALIMENA, G.; RABAULT, B.; GATHMANN, I.; FORD, J. M.; ALBERTI, D.; ROSE, C. Relative response of patients with myelodysplastic syndromes and other transfusion-dependent anaemias to deferasirox (ICL670): a 1-yr prospective study. **European Journal of Haematology**. v. 80, p. 168–176, 2007.

PORTER, J. B. Practical management of iron overload. **British Journal of Haematology**. v. 115, p. 239-252, 2001.

RABENSTEIN, D. L.; BROWN, D. W.; MCNEIL, C. J. Determination of glutathione in intact and hemolyzed erythrocytes by titration with tert-butyl hydroperoxide with end point detection by nuclear magnetic resonance spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 2294-2299, 1985.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; PAIVA-E-SILVA, R. B. A Portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, jul./ago. 2003.

RICE-EVANS, C. Iron-mediated oxidative stress and erythrocytes. In: HARRIS, J. R. **Blood Cell Biochemistry**. New York: Plenum Publishing, 1990. p. 429 – 453.

ROPER, D.; LAYTON, M.; LEWIS, S. M. Investigação das anemias hemolíticas hereditárias: anormalidades da membrana e de enzimas. In: LEWIS, S. M.; BRAIN, B. J.; BATES, In: **Hematologia prática de Dacie e Lewis**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 163 – 190.

ROSE, C.; BRECHIGNAC, S.; VASSILIEF, D.; PASCAL, L.; STAMATOULLAS, A.; GUERCI, A.; LARBAA, D.; DREYFUS, F.; BEYNE-RAUZY, O.; PIERRE CHAURY, M.; ROY, L.; CHEZE, S.; MOREL, P.; FENAU, P. Does iron chelation therapy improve survival in regularly transfused lower risk MDS patients? A multicenter study by the GFM. **Leukemia Research**. New York, v. 34, n. 7, p. 864-870, jul. 2010.

RUIZ, M. A. Anemia falciforme: objetivos e resultados no tratamento de uma doença de saúde pública no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São José do Rio Preto, v. 29, n. 3, p. 203, 2007.

SANTOS, A. F. **Ação de desferoxamina e deferiprona em eritrócitos de portadores de β -talassemia submetidos a sobrecarga oxidativa de *terc-butilhidroperóxido*, *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SANTOS, A. F.; BALDANZI, G.; LEONART, M.S.S.; NASCIMENTO, A.J. Protective action of deferiprone and desferoxamine in erythrocytes isolated from patients with β -thalassemias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 31, n. 6, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php>>. Acesso em 16/06/2010.

SCHRIER, S. L.; ANGELUCCI, E. New strategies in the treatment of the Thalassemias. **Annual Review of Medicine**. Palo Alto, v. 56, p. 157 – 17, 2005. Disponível em: <[HTTP://med.annualreviews.org](http://med.annualreviews.org)>. Acesso em: 17/7/2011.

SCOTT, M. D.; VAN DEN BERG, J. J. M.; REPKA, T.; ROUYER-FESSARD, P.; HEBBEL, R. P.; BEUZARD, Y.; LUBIN, B. H. Effect of excess α -hemoglobin chains on cellular and membrane oxidation in model β -thalassemic erythrocytes. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 91, n. 4, p. 1706-1712, 1993.

SIES, H. Glutathione and its roles in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 27, n. 9-10, p. 916-921, 1999.

SOUTO, E. X. Tratamento de suporte e quelação de ferro em pacientes com síndromes mielodisplásicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. São José do Rio Preto. v. 28, n. 3, jul/set. 2006.

STEINBERG, M. H. Sickle cell disease and associated hemoglobinopathies.. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil: Medicine**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. p. 1217 – 1226.

SZUBER, N.; BUSS, J. L.; SOE-LIN, S.; FELFLY, H.; TRUDEL, M.; PONKA, P. Alternative treatment paradigm for thalassemia using iron chelators. **Experimental Hematology**. v. 36, n. 7, p. 773-785, 2008.

TELEN, M. J.; KAUFMAN, R.E. The mature erythrocyte. In: GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N. **Wintrob's Clinical Hematology**. 11. Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2004. p. 421 – 484.

TROTTA, R. J.; SULLIVAN, S. G.; STERN, A. Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. **Biochemical Journal**. v. 204, p. 405-415, 1982.

URSINI, M. V.; PARRELLA, A.; ROSA, G.; SALZANO, S.; MARTINI, G. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. **Biochemical Journal**. Great Britain, v. 323, p. 801-806, 1997.

VAN DER ZEE, J.; VAN STEVENINCK, J.; KOSTER, J. F.; DUBBELMAN, T. M. A. R. Inhibition of enzymes and oxidative damage of red blood cells induced by t-butylhydroperoxide-derived radicals. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 980, p. 175-180, 1989.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. São Paulo, v. 30. n. 5, set/out. 2007.

VICHINSKY, E.; ONYEKWERE, O.; PORTER, J.; SWEREDLOW, P.; ECKMAN, J.; LANE, P.; FILES, B.; HASSELL, K.; KELLY, P.; WILSON, F.; BERNAUDIN, F.; FORNI, G.L.; OKPALA, I.; RESSAYRE-DJAFER, C.; ALBERTI, D.; HOLLAND, J.; MARKS, P.; FUNG, E.; FISCHER, R. MUELLER, B.U.; COATES, T. A randomised comparison of deferasirox versus deferoxamine for the treatment of transfusional iron overload in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**. Reino Unido, v. 136, p. 501–508, 2006.

VICHINSKY, E.; PAKBAZ, Z.; ONYEKWERE, O.; PORTER, J.; SWERDLOW, P.; COATES, T.; LANE, P.; FILES, B.; MUELLER, B. U.; COÏC, L.; FORNI, G. L.; FISCHER, R.; MARKS, P.; ROFAIL, D.; ABETZ, L.; BALADI, J-F. Patient-reported outcomes of deferasirox (Exjade®, ICL670) versus deferoxamine in sickle cell disease patients with transfusional hemosiderosis. **Acta Haematologica**. v. 119, p. 133-141, 2008.

WALTER, P. B.; MACKLIN, E. A.; PORTER, J.; EVANS, P.; KWIATKOWSKI, J. L.; NEUFELD, E. J.; COATES, T.; GIARDINA, P. J.; VICHINSKY, E.; OLIVIERI, N.; ALBERTI, D.; HOLLAND, J.; HARMATZ, P. Inflammation and oxidant-stress in β -thalassemia patients treated with iron chelators deferasirox (ICL670) or deferoxamine: an ancillary study of the Novartis C1CL670A0107 trial. **Haematologica**, California, v. 93, n. 6, p. 817-825, 2008.

WANG, W. C. The sickle cell anemia and other sickling syndromes. In: GREER, J. P.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 11. Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2004. p. 2528 – 2633.

WASOWICZ, W.; NÈVE, J.; PEREZ, A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. **Clinical Chemistry**. v. 39, n. 12, p. 2522-2526, 1993.

WILD, B.J.; BAIN, B. J. Investigação de hemoglobinas anormais e talassemia. In: LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. In: **Hematologia prática de Dacie e Lewis**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 272 – 307.

WORWOOD, M. Anemia ferropênica e sobrecarga de ferro. In: LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. In: **Hematologia prática de Dacie e Lewis**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 132 – 155.

ZAVODNIK, L. B.; ZAVODNIK, I. B.; NIEKURZAK, A.; SZOSLAND, K.; BRYSEWSKA, M. Activation of red blood cell glutathione peroxidase and morphological transformation of erythrocytes under the action of *tert*-butyl hydroperoxide. **Biochemistry and Molecular Biology International**. v. 44, n. 3, p. 577-588, mar. 1998.

ANEXOS

ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Ação de desferoxamina e deferasirox em eritrócitos de portadores de anemias hemolíticas submetidos à sobrecarga oxidativa de *terc*-butilhidroperóxido, *in vitro*

Investigador responsável: Priscila Bacarin Hermann – Aluna de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR.

Local da pesquisa: Laboratório Clínico Escola e Laboratório de Citologia e Hematologia Clínica do curso de Farmácia da UFPR.

Contato: Priscila (41) 3360-4084 (41) 9621-0918. Av. Lothario Meissner, 632 – Jardim Botânico – CEP 80.210-170. Segunda a sexta-feira das 14:00 às 18:00

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto “Ação de desferoxamina e deferasirox em eritrócitos de portadores de anemias hemolíticas submetidos à sobrecarga oxidativa de *terc*-butilhidroperóxido, *in vitro*”, sob a responsabilidade da pesquisadora Priscila Bacarin Hermann. Este projeto tem por objetivo estudar o efeito de dois medicamentos, desferoxamina e deferasirox, que são utilizados por pacientes portadores de anemias hemolíticas no tratamento da retirada do ferro em excesso no sangue. Este tratamento já traz um benefício importante para todos os pacientes que o utilizam, com melhoria da qualidade de vida e mesmo da sobrevida. Os estudos que estão sendo feitos podem contribuir para aumentar os benefícios destes medicamentos, principalmente se indicarem que a desferoxamina pode vir a ser substituída pelo desferasirox, que é administrado por via oral.

Você é livre para aceitar ou recusar-se a participar deste estudo. Caso você aceite participar, o tratamento em curso com o seu médico continuará exatamente o mesmo, não havendo nenhuma possibilidade de uso de placebo ou qualquer outra alteração. O único desconforto será a coleta de seu sangue ou do paciente pelo qual é responsável, como já ocorre para os exames de rotina feitos no HEMEPAR, com a punção de cerca de 10 ml a mais para a realização dos testes que envolvem estudo da anemia hemolítica nesta pesquisa. Assim, não haverá nenhum desconforto adicional. Não haverá benefício direto aos voluntários, mas sim indiretos, por

proporcionar avanços científicos relacionados ao conhecimento da doença e dos tratamentos em questão.

Reafirmamos que sua participação nesse estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou retirar seu consentimento sem penalização, a qualquer momento. Você não receberá nenhum benefício financeiro e nem terá de pagar qualquer valor pela participação no estudo.

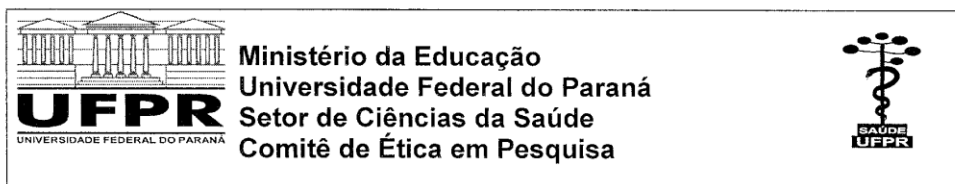
Todos os dados coletados serão mantidos de forma confidencial e serão usados para a avaliação do estudo. As identidades serão substituídas por códigos mantendo a confidencialidade. Membros das Autoridades de Saúde ou do Comitê de Ética podem revisar os dados fornecidos. Os dados também podem ser usados em publicações científicas sobre o assunto pesquisado. Porém, sua identidade não será revelada em qualquer circunstância.

Se tiver qualquer dúvida com relação ao estudo, você poderá entrar em contato com a pesquisadora Priscila Bacarin Hermann pelos telefones 3360-4084 ou 9621-0918, no Laboratório de Citologia e Hematologia ou no Laboratório Clínico Escola do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná das 14 às 18 horas de segunda a sexta-feira, e poderá receber esclarecimentos de forma detalhada sobre o andamento da pesquisa. Estão garantidas todas as informações que você queira, antes, durante ou depois do estudo.

Eu li e discuti com a investigadora responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

_____	_____	_____
NOME DO PACIENTE	ASSINATURA	DATA
_____	_____	_____
NOME DO RESPONSÁVEL	ASSINATURA	DATA
(Se menor ou incapacitado)		
_____	_____	_____
NOME DO INVESTIGADOR	ASSINATURA	DATA

ANEXO II - PROTOCOLO CEP/SD



Curitiba, 23 de novembro de 2010.

Ilmo (a) Sr. (a)
Priscila Bacarin Hermann
Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),


Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Ação de desferoxamina e deferisirox em eritrócitos de portadores de anemias hemolíticas submetidos à sobrecarga oxidativa de terc-butilhidroperóxido in vitro”** está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 25 de agosto de 2010 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 22 de setembro de 2010.

Registro **CEP/SD**: 979.104.10.08 **CAAE**: 3862.0.000.091-10

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 22/05/2011

Atenciosamente


Prof.ª Dr.ª Claudia Seely Rocco
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP 80060-240
Fone: (41)3360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Anexos